

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année : 2018

N° 2018-173

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DE BIOLOGIE MEDICALE

par

Julie FIRMIN

née le 14 juillet 1987 à Pontivy

Présentée et soutenue publiquement le 22 octobre 2018

CARACTERISATION DU TROPHECTODERME HUMAIN PRE-IMPLANTATOIRE
VERS L'IDENTIFICATION DE MARQUEURS SPECIFIQUES DE LA QUALITE
EMBRYONNAIRE EN FECONDATION *IN VITRO*.

Président : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Thomas FREOUR

Mes remerciements vont :

Au président du jury :

Monsieur le Professeur Paul BARRIERE

qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ma soutenance de thèse. Ses enseignements et sa bienveillance m'ont été précieux tout au long de ces trois semestres de formation au laboratoire de Biologie de la Reproduction. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Thomas FREOUR

qui m'a permis de découvrir et d'aimer la Biologie de la Reproduction, grâce à son sens de la pédagogie et à son dynamisme, et qui a soutenu la réalisation de mon Master2 recherche ainsi que de mon inter-CHU.

Aux membres du jury :

Madame la Professeure Virginie FERRE

qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer à ma soutenance de thèse et de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Laurent DAVID

qui m'a accueillie au sein de son équipe de recherche. Grâce à lui, le monde de la recherche fut une véritable découverte. Sa réflexion et son sens critique m'ont été et me seront toujours précieux.

A l'équipe du service de Biologie de la Reproduction du CHU de Nantes :

A l'équipe médicale : Sophie MIRRALIE, Carole SPLINGART et Arnaud REIGNIER, docteurs, et Jenna LAMMERS, ingénieure, pour m'avoir transmis au quotidien, et dans la bonne humeur, leurs savoir-faire et leurs conseils.

A l'équipe de techniciens (par ordre alphabétique) : Audrey, Delphine J., Delphine R., Fabienne, Florence, Marie-Luce, Marine, Pierre et Sandrine qui, avec patience et rigueur m'ont permis d'acquérir les techniques de la biologie de la reproduction, ainsi qu'à Blandine, secrétaire, pour m'avoir apporté son aide précieuse notamment pour la gestion des rendez-vous.

A l'ensemble du service : aux médecins gynécologues et endocrinologues, et aux sages-femmes, au contact desquelles il y a toujours quelque chose à apprendre, aux secrétaires et AH qui contribuent à la bonne ambiance de travail.

A l'équipe 2 de l'UMR 1064 de l'INSERM de Nantes :

A Stéphanie, Anne, Caroline, Aude, Dimitri : pour m'avoir fait un peu de place dans les locaux et surtout m'avoir fait partager leurs connaissances avec une grande gentillesse.

A mes parents et à ma famille : pour m'avoir toujours soutenue dans tous les choix bons (ou moins bons !) que j'ai faits.

A mes amis : ils sont la famille que l'on se choisit !

Table des matières

1. INTRODUCTION	5
1.1. FECONDATION <i>IN VITRO</i>	6
1.2. EVALUATION DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE	8
1.3. RAPPELS CONCERNANT LA REPRODUCTION	10
1.4. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE ET DIFFERENCIATION DES LIGNEES	11
1.5. DEVENIR DU TROPHECTODERME (TE) PRE-IMPLANTATOIRE	13
1.6. LE PSEUDO-TEMPS : MODELISATION DE LA SPECIFICATION DES LIGNEES DE L'EMBRYON HUMAIN PRE-IMPLANTATOIRE	14
1.7. OBJECTIFS	16
2. MATERIEL ET METHODES	18
2.1. MATERIEL ET METHODES RELATIFS A L'ETUDE DE L'IMPACT DE LA GRADUATION MORPHOLOGIQUE DU BLASTOCYTE	18
2.1.1 <i>Population</i>	18
2.1.2 <i>Protocole de stimulation ovarienne et ponction des ovocytes</i>	19
2.1.3 <i>Protocole de culture des embryons à J5</i>	19
2.1.4 <i>Evaluation des embryons en système time-lapse Embryoscope®</i>	19
2.1.5 <i>Définitions des critères de jugement</i>	20
2.1.6 <i>Analyses statistiques</i>	20
2.2. MATERIEL ET METHODES RELATIFS A LA DETERMINATION DE MARQUEURS DE LA LIGNEE TROPHOBLASTIQUE DANS L'EMBRYON HUMAIN PRE-IMPLANTATOIRE	21
2.2.1 <i>Embryons humains pré-implantatoires</i>	21
2.2.2 <i>Culture des embryons humains pré-implantatoires</i>	21
2.2.3 <i>Acquisition des données des embryons humains en incubateur time-lapse</i>	22
2.2.4 <i>Séquençage ARN en cellules uniques</i>	22
2.2.5 <i>Immunofluorescence des embryons humains</i>	22
3. RESULTATS	23
3.1. ETUDE DE L'IMPACT DE LA GRADUATION MORPHOLOGIQUE DU BLASTOCYTE	23
3.1.1 <i>Caractéristiques de la population</i>	23
3.1.2 <i>Comparaison des taux de naissances vivantes en fonction de la morphologie de l'embryon</i>	27
3.1.3 <i>Etude de la corrélation en fonction de l'issue clinique « naissances vivantes »</i> . 29	
3.2. DETERMINATION DE MARQUEURS DE LA LIGNEE TROPHOBLASTIQUE DANS L'EMBRYON HUMAIN PRE-IMPLANTATOIRE	31
3.2.1 <i>Première différenciation de lignée TE/ICM chez l'Homme</i>	31
3.2.2 <i>Identification d'une signature du TE</i>	33
4. DISCUSSION	38

4.1. ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA GRADUATION MORPHOLOGIQUE DU BLASTOCYSTE	38
4.2. DETERMINATION DE MARQUEURS DE LA LIGNEE TROPHOBLASTIQUE DANS L'EMBRYON HUMAIN PRE-IMPLANTATOIRE	41
5. CONCLUSION.....	44
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45
7. ANNEXES.....	51
LISTE DES FIGURES.....	51
LISTE DES TABLES	51
LISTE DES ABREVIATIONS	52
ANNEXE 1. CONSENSUS DE CLASSIFICATION DES BLASTOCYSTES SUIVANT LA CLASSIFICATION DE GARDNER ET SCHOOLCRAFT	53
ANNEXE 2. LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES POUR L'IMMUNOFLUORESCENCE DES EMBRYONS HUMAINS PRE-IMPLANTATOIRES	54
ANNEXE 3. CARACTERISTIQUES DES CYCLES AVEC GRADUATION MORPHOLOGIQUE DE L'ICM ET DU TE EN FONCTION DE L'IMPLANTATION.....	55
ANNEXE 4. ANALYSE DESCRIPTIVE DE LA MORPHOLOGIE EMBRYONNAIRE ET DE L'IMPLANTATION	58
ANNEXE 5. ÉTUDE DE LA CORRELATION EN FONCTION DE L'ISSUE CLINIQUE « NAISSANCES VIVANTES ».....	59
ANNEXE 6. ÉTUDE DE LA CORRELATION EN FONCTION DE L'IMPLANTATION	60
ANNEXE 7. IMMUNOFLUORESCENCE GATA3.....	61

1. Introduction

L'infertilité est définie par l'organisation mondiale de la santé comme étant « une pathologie du système reproductif caractérisée par l'absence de la survenue d'une grossesse clinique après au moins douze mois de rapports sexuels non protégés et réguliers » (1). Dans les pays développés, la prévalence de l'infertilité est élevée avec plus de « 186 millions de femmes mariées en âge de procréer ayant un désir d'enfants » ce qui représente un couple sur quatre (WHO 2018). L'essor de différentes techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP), à partir de la seconde moitié du XIXème siècle, a permis et permet à de nombreux couples inféconds de devenir parents. A l'échelle européenne, le dernier rapport de l'ESHRE (2) fait état, en 2014, que 0,7% (à Malte) à 6,2% (au Danemark) des nouveau-nés sont issus d'une tentative de fécondation *in vitro* (FIV). En France, pour cette même période, 18 641 nouveaux nés ont vu le jour, suite à une tentative de FIV, ce qui représente 2,3% des naissances (3). Ces chiffres sont en constante augmentation, notamment en Europe (Table.1) (2).

Table 1. Nombre de centres d'AMP, de cycles de traitement et de nouveau-nés après AMP en Europe de 1997 à 2014 (d'après De Geyter et al., 2018)

Année	Pays	Centres	Cycles	Augmentation de cycles (%)	Nouveau-nés
1997	18	482	203 225		35 314
1998	18	521	232 225	+14.3	21 433
1999	21	537	249 624	+7.5	26 212
2000	22	569	275 187	+10.2	17 887
2001	23	579	289 690	+5.3	24 963
2002	25	631	324 238	+11.9	24 283
2003	28	725	365 103	+12.6	68 931
2004	29	785	367 056	+0.5	67 973
2005	30	923	419 037	+14.2	72 184
2006	32	998	458 759	+9.5	87 705
2007	33	1029	493 420	+7.7	96 690
2008	36	1051	532 260	+7.9	107 383
2009	34	1005	537 463	+1.0	109 239
2010	31	991	550 296	+2.4	120 676
2011	33	1314	550 296	+11.3	134 106
2012	34	1354	609 973	+4.9	143 844
2013	38	1169	686 271	+7.2	149 466
2014	39	1279	776 556	+13.1	170 163
Total			8 010 527		1 478 452

1.1. Fécondation *in vitro*

L'AMP désigne l'ensemble des techniques médicales destinées à aider à la procréation par la manipulation de gamètes au laboratoire. La FIV est une de ces techniques. A la différence de l'insémination, la FIV nécessite une ponction des ovocytes après une période de stimulation ovarienne. Les ovocytes recueillis sont ensuite mis en présence des spermatozoïdes. Dans le cadre de la FIV-classique, les spermatozoïdes sont déposés dans des puits de culture, à proximité des ovocytes. Dans le cadre de la FIV avec injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (FIV-ICSI), un spermatozoïde est sélectionné puis injecté directement dans le cytoplasme d'un ovocyte. A l'issue de ces deux procédures, les ovocytes fécondés sont mis en culture. Les embryons obtenus peuvent-être transférés dans l'utérus maternel ou bien être cryopréservés en vue d'un transfert différé (**Fig. 1**).

Historiquement, Louise Brown est le premier enfant issu d'une FIV en 1978. Ce succès fut le fruit du travail de Patrick Seftoe, chirurgien gynécologue, et de Robert Edwards, physiologiste, à l'Oldam General Hospital en Angleterre (4). En France, la première naissance après une FIV a eu lieu en 1982, à l'hôpital de Clamart sous la collaboration de René Frydman, gynécologue obstétricien, avec Jacques Testart, biologiste.

La FIV-ICSI est une technique plus récente. Elle a été mise au point en 1992 au centre hospitalo-universitaire de Vrije Universiteit de Bruxelles en Belgique par le chercheur Paul Devroey et, en France, la première naissance après FIV-ICSI a eu lieu en 1994.

Cependant malgré l'essor de ces techniques, les taux de réussite en FIV restent limités. A chaque tentative, seuls 20% des couples pris en charge accèdent à la parentalité (5). Ces résultats sont imputables à plusieurs facteurs :

- le faible niveau de fécondité de l'espèce humaine (6),
- la qualité des gamètes (en fonction des pathologies maternelles ou paternelles, de l'exposition parentale à des toxiques, de l'âge maternel (**Fig. 2**), des protocoles de stimulation ovarienne...),
- la réceptivité utérine et le développement placentaire,
- la qualité des embryons à transférer (**Fig. 2**).

Améliorer ce dernier point est un enjeu majeur pour les laboratoires des centres clinico-biologiques d'AMP.

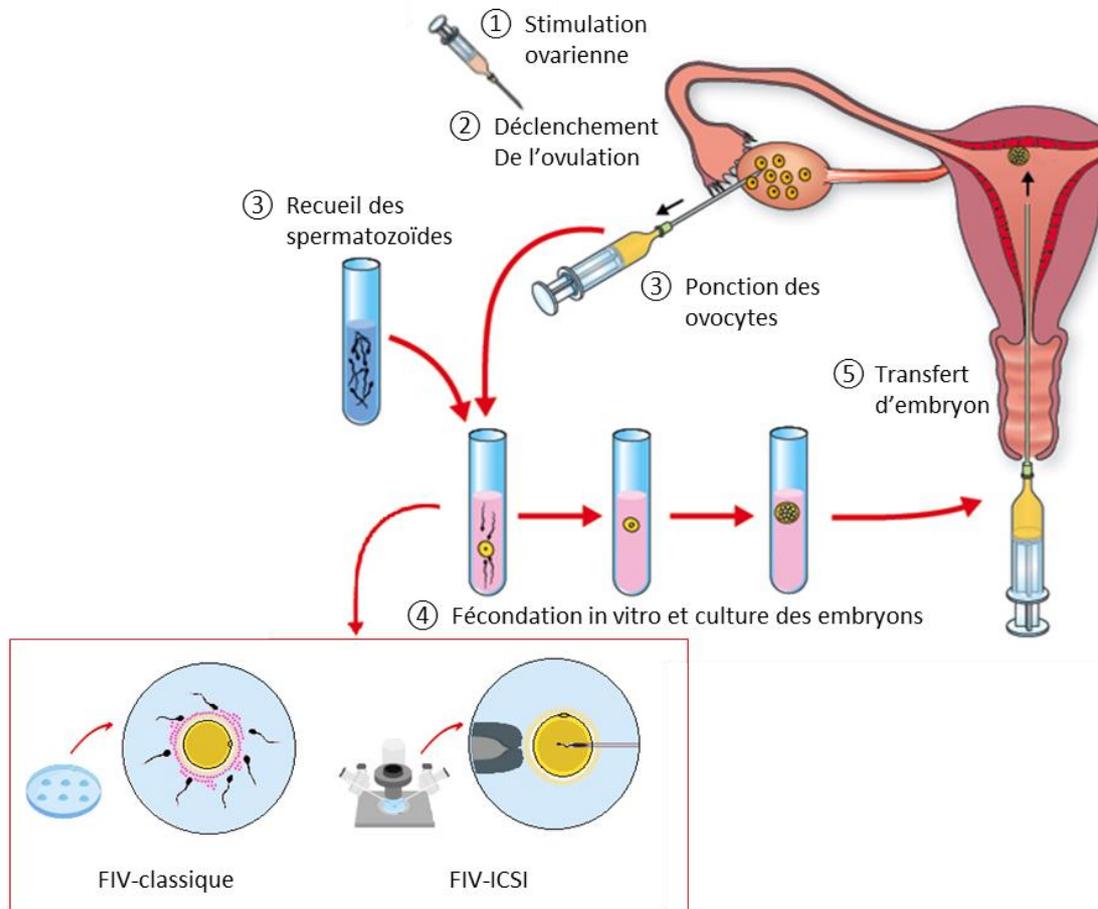
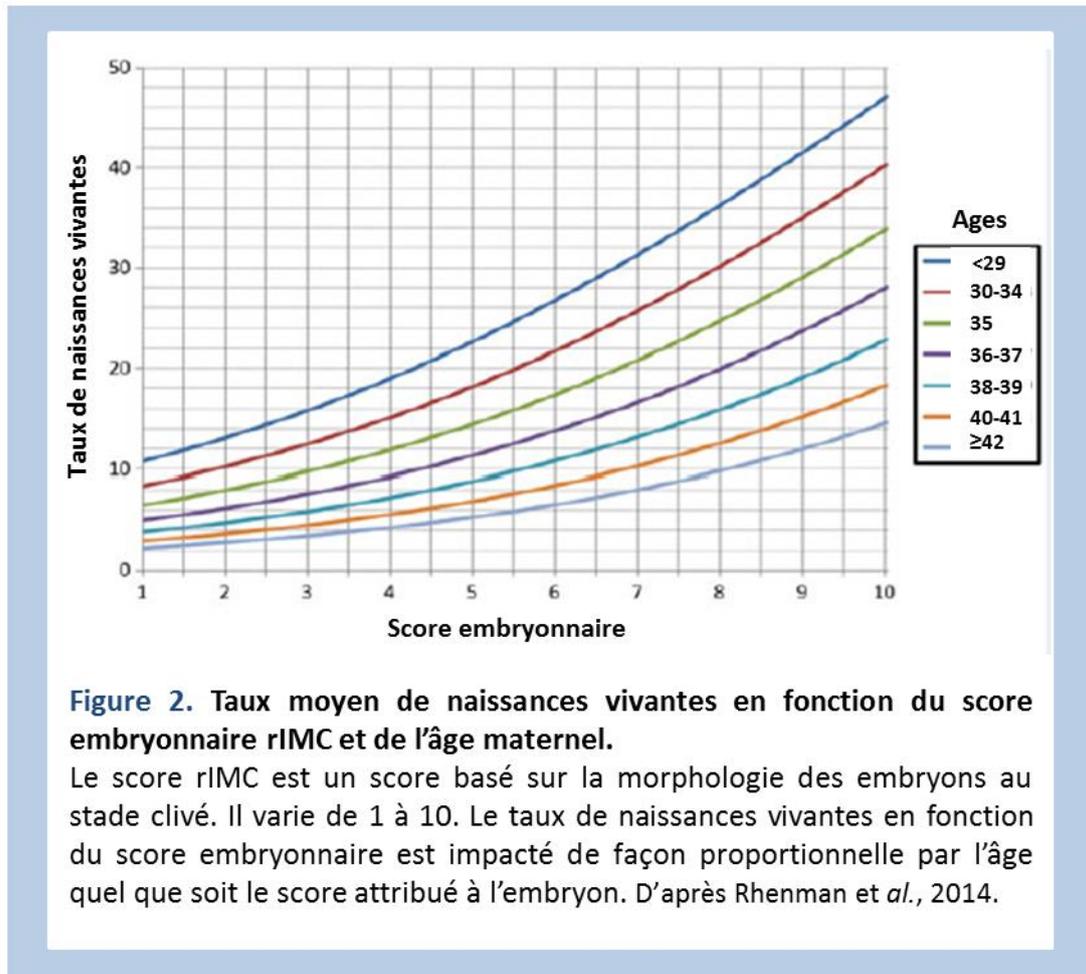


Figure 1. Fécondation *in vitro*

Schéma récapitulatif des étapes de la fécondation *in vitro*. Notes : FIV = fécondation *in vitro*, ICSI = injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes.



1.2. Evaluation de la qualité embryonnaire

Actuellement et de façon consensuelle à travers le monde, la qualité embryonnaire repose sur l'évaluation de critères morphologiques au cours du développement des embryons. Pour ce faire, les embryons sont gradués, après observation sous microscope à des temps précis (7).

L'amélioration des conditions de culture (étuves tri-gaz, milieux) a permis de pousser les embryons en culture jusqu'au stade de blastocyste avec un transfert embryonnaire ayant lieu au 5^{ème} jour de développement (J5). Cette stratégie de transfert après une culture prolongée présente les avantages :

- de sélectionner l'embryon le plus viable (8),
- de respecter la synergie entre l'utérus maternel et l'embryon, puisque physiologiquement l'embryon atteint la cavité utérine à partir du 4^{ème} jour de développement (9) et que la pulsatilité utérine à J5 est plus favorable au maintien de l'embryon (10),

- de privilégier le transfert mono-embryonnaire (SET) (11), limitant ainsi les risques inhérents aux grossesses multiples (fausses couches, prématurité, retard de croissance, syndrome transfuseur-transfusé).

A ce stade blastocyste, à J5, le référentiel utilisé pour la graduation des embryons est la classification de Gardner (12) (**Annexe. 1**). Les blastocystes sont évalués sur trois contingents différents :

- le développement du blastocyste tenant compte de la cavitation, de l'expansion ou de l'éclosion du blastocyste. Gradués de 1 : blastocyste non expansé avec début de cavitation, à 6 : blastocyste totalement éclos.
- la qualité de la masse cellulaire interne (ICM). Graduée de A : ICM compacte, à C : absence d'ICM.
- la qualité du trophoctoderme (TE). Graduée de A : TE cellulaire avec un aspect festonné des bords, à C : absence de TE.

L'objectif de cette classification est de sélectionner l'embryon ayant le meilleur potentiel de développement et, au final, la plus grande probabilité d'aboutir à une naissance vivante. S'il est bien établi que le score combinant les trois paramètres est prédictif du devenir de l'embryon, la capacité de chaque paramètre à prédire de façon indépendante le devenir clinique des embryons est moins claire. Or, pour choisir l'embryon à transférer parmi plusieurs embryons ayant un score équivalent (par combinaison des trois paramètres), il est nécessaire de comprendre la contribution de chaque paramètre.

Depuis les années 2000, plusieurs équipes se sont intéressées à ce sujet mais ont trouvé des résultats divergents. Certaines études ont montré que le timing de développement du blastocœle et le degré de son expansion étaient des facteurs prédictifs de l'implantation des embryons (13,14), d'autres ont rapporté une corrélation entre la morphologie de l'ICM (sa taille et sa forme) et l'implantation (13,15) ; quant au TE, suivant les équipes les résultats divergent : il a été montré une corrélation positive avec l'implantation ou, au contraire, aucune association (15,16). Cependant, la politique de transfert de plusieurs embryons, qui prévalait à l'époque, limite l'interprétation des résultats. En effet, des embryons de différents grades pouvaient être transférés en même temps. Il n'était pas rare que des blastocystes avec une ICM de grade A et un TE de grade B soient transférés avec des blastocystes ayant une ICM de grade B et un TE de grade A.

De façon surprenante, en 2011, le consensus d'Istanbul ne répond pas à cette ambiguïté mais il suggère que l'ICM est le paramètre le plus important pour déterminer le potentiel d'implantation d'un blastocyste (7).

Depuis lors, plusieurs études portant sur des transferts mono-embryonnaires ont été publiées. Elles ont permis de mettre en évidence l'importance du grade de l'expansion du blastocyste au moment du transfert (17-21), mais peinent à identifier la contribution du grade

de l'ICM ou du grade du TE comme marqueur prédictif de l'implantation des embryons, en raison de résultats contradictoires (18). Cependant, récemment, bon nombre d'études tendent à souligner le pouvoir prédictif de l'évaluation du TE pour le devenir des embryons transférés (22-24). La plus récente d'entre elles (25) se restreint aux transferts mono-embryonnaires euploïdes. Elle permet de s'abstraire de l'effet confondant des anomalies de la ploïdie lors de la graduation des embryons. Les résultats montrent des taux de naissances vivantes similaires pour des blastocystes avec un TE grade A ou B ou des blastocystes avec une ICM grade A. Ces considérations amènent à revoir les stratégies de sélection de l'embryon à transférer en insistant sur l'importance de l'évaluation morphologique du TE. Cependant il existe une grande variabilité inter et intra-observateurs dans la graduation des embryons en lecture « conventionnelle », rendant l'évaluation morphologique des embryons peu sensible et peu reproductible, avec une valeur prédictive positive modeste (26-28). C'est pourquoi il est fondamental de rechercher d'autres marqueurs spécifiques de la qualité embryonnaire en FIV et plus particulièrement la qualité du TE des embryons. Cette étape nécessite de caractériser le TE humain durant le développement embryonnaire pré-implantatoire.

1.3. Rappels concernant la reproduction

La reproduction est une grande fonction du vivant. Toute espèce vivante se reproduit, c'est même sa caractéristique principale et générale. Lorsqu'elle cesse de se reproduire, elle s'éteint. Dans l'espèce humaine la reproduction est sexuée. Et même si la nécessité de l'union entre deux parents de sexe opposé est évoquée dès la plus haute Antiquité dans les textes sumériens, la théorie de la fécondation n'est formalisée qu'au XIXème siècle par l'allemand Oskar Hertwig. Il en est de même pour l'embryologie : son origine remonte à l'Antiquité mais les premiers traités connus, notamment rédigés par Aristote, reposent sur des hypothèses fantaisistes. Il faut attendre le milieu du XVIIème siècle et les prémices de l'embryologie descriptive avec William Harvey pour voir émerger la notion d'épigénèse selon laquelle les organes de l'adultes se différencient graduellement. Au XIXème siècle, Robert Remak montre l'existence des trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Le XXème siècle voit l'avènement de la biologie moléculaire et de l'embryologie expérimentale, et c'est désormais avec ces outils que l'embryologie moderne aborde le problème du développement. La différenciation cellulaire étant le résultat de l'expression différentielle de gènes à partir d'une cellule unique.

1.4. Développement embryonnaire précoce et différenciation des lignées

Chez les mammifères, l'embryogénèse débute avec le zygote : cellule unique et totipotente. Cette cellule résulte de la fécondation de l'ovocyte par un spermatozoïde. Elle contient l'information génétique des deux parents mais est transcriptionnellement inactive. L'initiation de la première division cellulaire est contrôlée par des ARNm et par des protéines d'origine maternelle. L'activation du génome embryonnaire a lieu, chez l'homme, entre les stades 4 et 8-cellules (29). A ce stade, on considère que les cellules sont toutes équivalentes et totipotentes (**Fig. 3A et 3B**) (30).

Alors que la première ségrégation de lignées cellulaires entre le TE et l'ICM est clairement identifiée au stade morula chez la souris (31), il semble que le processus soit retardé dans l'embryon humain et qu'il ne fasse pas intervenir les mêmes acteurs moléculaires (32). Ainsi le facteur de transcription CDX2 (**Fig. 3C**), facteur-clé de la différenciation trophoblastique chez la souris au stade morula, n'est exprimé qu'après la formation du blastocyste dans l'embryon humain (30,33). D'autres facteurs, comme ELF5 et EOMES, qui sont impliqués dans le réseau de régulation de la différenciation trophoblastique de l'embryon murin et la voie de signalisation TAZ/YAP (**Fig. 3C**), ne sont pas exprimés à ces stades chez l'homme (29,33,34). A contrario, l'expression du facteur de pluripotence OCT4 n'est pas restreint à la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste humain et co-localise avec l'expression de CDX2 dans le TE (33). Les résultats expérimentaux (analyses transcriptomiques, d'immunofluorescences, premier knock out humain), bien que limités, supportent l'hypothèse qu'il existe des différences moléculaires notables entre la spécification des lignées préimplantatoires, chez l'homme et la souris. Des différences épigénétiques existent également telles que l'inactivation aléatoire du chromosome X dans le TE humain ou une dynamique de méthylation *de novo* du génome propre au TE (35).

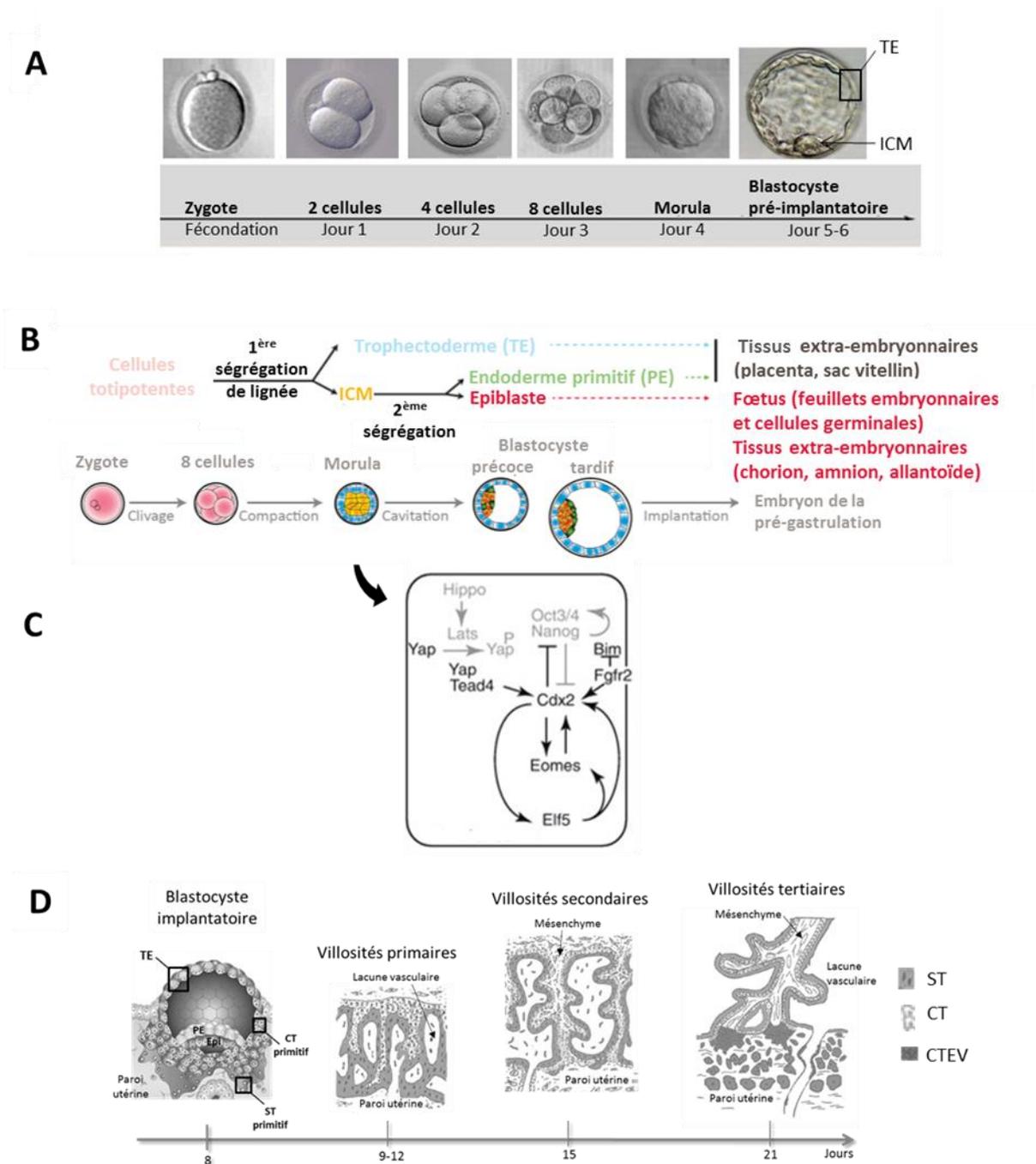


Figure 3. Développement embryonnaire

A. Développement pré-implantatoire humain durant les 6 premiers jours de vie, du stade de cellule unique: zygote, jusqu'au stade de blastocyste pré-implantatoire. **B.** Représentation schématique de la ségrégation des lignées cellulaires au cours du développement humain pré-implantatoire. **C.** Voie de signalisation HIPPO impliquée dans la différenciation trophoblastique de l'embryon de souris au stade morula. Les voies activées sont représentées en noir, les voies réprimées en gris. **D.** Représentation schématique du développement la lignée trophoblastique après implantation de l'embryon humain. Notes: Epi = épiblaste, PE = endoderme primitif, ICM = masse cellulaire interne, TE = trophoblaste, ST = syncytiotrophoblaste, CT = cytotrophoblaste, CTEV =cytotrophoblaste extra-villeux

1.5. Devenir du TE pré-implantatoire

Au 7^{ème} jour de développement, le blastocyste vient au contact de la muqueuse utérine pour initier l'implantation. Ce processus physiologique, et paradoxal (puisqu'il repose sur l'attachement de deux épithéliums), nécessite l'acquisition de compétences (maturation) au niveau de l'endomètre, du blastocyste (notamment du TE-préimplantatoire) mais aussi du micro-environnement utérin (36). Il comprend trois phases :

- l'apposition : attachement du blastocyste à l'endomètre par contact entre le TE pré-implantatoire et l'épithélium utérin mettant en jeu la L-sélectine au niveau de la surface du blastocyste,
- l'adhésion : attachement plus stable du blastocyste à l'endomètre caractérisé par un remaniement des microvillosités apicales et une redistribution de molécules d'adhérence cellulaire : intégrines ($\alpha\beta3$), ostéopontine, mucines, troponine...
- l'invasion : enfouissement du blastocyste dans la paroi utérine sous l'effet de la différenciation du TE pré-implantatoire.

Contrairement à d'autres espèces, chez l'Homme, le blastocyste adhère systématiquement à l'épithélium endométrial par le TE pré-implantatoire adjacent à l'ICM, dénommé TE polaire. Cela suggère qu'il pourrait exister au sein du TE pré-implantatoire une différence entre les cellules polaires et murales. Elle pourrait être médiée par des facteurs provenant de l'ICM (37). Il semble aussi que les cellules du TE pré-implantatoire doivent acquérir une capacité à l'implantation. Par exemple, la sécrétion d'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) par le TE pré-implantatoire est nécessaire au dialogue moléculaire et à l'induction d'une tolérance immunitaire entre le blastocyste et l'endomètre (38,39). De façon intéressante des études ont montré que plus les embryons avaient un TE-pré-implantatoire de bon grade, plus ces embryons sécrétaient de l'hCG précocement et à des concentrations plus élevées (40, 41). D'autres données montrent des différences du profil de transcription entre le TE pré-implantatoire d'embryons ayant abouti à une grossesse ou à une naissance vivante et ceux ne s'étant pas implantés (42,43). Les gènes surexprimés sont notamment impliqués dans l'adhésion et la communication cellulaire.

Au moment de l'invasion, les cellules du TE pré-implantatoire se différencient morphologiquement et fonctionnellement en syncytiotrophoblaste (ST) primitif multinucléé et en cytotrophoblaste (CT) primitif mononucléé. Le ST primitif sécrète des enzymes (sérines protéases, métallo-protéases, collagénases...) qui permettent l'envahissement de la paroi utérine puis de la décidue, et la formation de lacunes. Secondairement, le ST est envahi par du CT primitif pour former les villosités primaires. Cette structure évolue jusqu'à la 5^{ème} semaine de gestation pour former les villosités tertiaires et constitue la structure définitive du

placenta (44). A ce stade, trois populations cellulaires matures coexistent : le CT vilieux, le ST et le CT extra-vilieux (CTEV). Le CT vilieux assure les fonctions d'échanges gazeux et nutritionnels. Au niveau des lacunes vasculaires, dans lesquelles circule le sang maternel, le CT vilieux fusionne et forme des cellules multi-nucléées : le ST qui assure les fonctions endocrines du placenta (synthèse d'hormone chorionique gonadotrope humaine hCG, de progestérone, d'hormone lactogène placentaire humaine hPL). Le CTEV constitue la partie distale des colonnes de CT et envahit l'endomètre pour aller au contact des artères utérines maternelles (**Fig. 3D**).

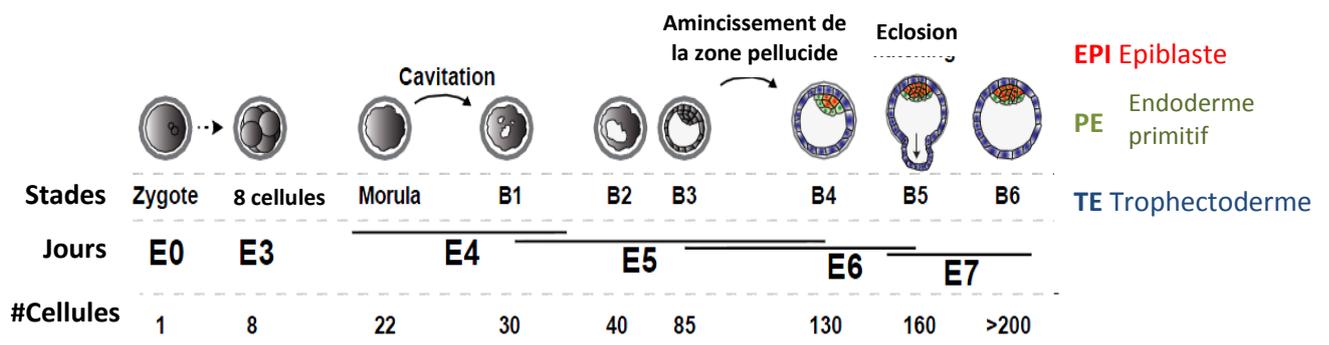


Figure 4. Cinétique du développement embryonnaire

Correspondance entre différentes méthodes de gradation de l'embryon humain pré-implantatoire. Le stade désigne la classification utilisée d'après le consensus d'Istanbul (ESHRE 2011). Le jour correspond au jour de développement embryonnaire. #Cellules correspond à une approximation du nombre de cellules composant l'embryon au regard de son stade de développement.

1.6. Le pseudo-temps : modélisation de la spécification des lignées de l'embryon humain pré-implantatoire

Ces dernières années, plusieurs équipes se sont intéressées à l'analyse du profil de transcription de l'embryon humain pré-implantatoire :

- soit à titre fondamental pour comprendre le développement de l'embryon humain (29,34,45),
- soit pour trouver des marqueurs de la viabilité des embryons à transférer en FIV (42,43).

Cela a été rendu possible grâce à l'amélioration des technologies de biologie moléculaire et cellulaire. Elles permettent désormais d'obtenir des données transcriptomiques, avec un niveau de précision élevé, à partir de très petites quantités d'échantillons. C'est une condition sine qua non pour l'étude des embryons humains qui sont composés de peu de cellules (**Fig. 4**). Une autre problématique est que le développement des embryons est un processus extrêmement dynamique avec des phases d'inactivation de la transcription puis

des phases de transcription massive. Cette variabilité d'activité dans, un laps de temps très court, doit être prise en compte dans la méthodologie des analyses réalisées.

Dans ce contexte, avec l'équipe 2 de l'UMR 1064 du Dr Laurent DAVID à l'INSERM de Nantes, nous avons généré un modèle de développement de l'embryon humain pré-implantatoire : le pseudo-temps, en analysant un large jeu de données obtenu par séquençage ARN de cellules uniques (scRNAseq). Notre propre jeu de données de 150 cellules, issues de 24 embryons, a été combiné avec les jeux de données de F. Tang (45), F. Lanner (34) et K. Niakan (46). Au total 1751 cellules, issues de 128 embryons, ont été analysées. Notre pseudo-temps permet de coupler les données morphocinétiques d'embryons humains avec le profil de transcription des cellules issues de ces embryons. En effet, pour notre propre jeu de données, la culture embryonnaire était réalisée en incubateur time-lapse ce qui garantit une annotation précise du stade des embryons suivant la classification du consensus d'Istanbul (7). De plus, avant analyse, nos embryons ont été disséqués au laser afin de séparer d'un côté : le TE pré-implantatoire mural et de l'autre côté : le TE pré-implantatoire et l'ICM (**Fig. 5A**). Les valeurs obtenues par scRNAseq ne sont pas directement interprétables pour réaliser une comparaison quantitative des niveaux d'expression des gènes, mais elles fournissent des informations clés quant à l'identité des cellules. En conséquence, des groupes de cellules peuvent être comparés. Pour comprendre le développement pré-implantatoire, la matrice d'expression a été utilisée (après normalisation et correction des biais d'analyses) pour générer informatiquement avec Monocle2 notre pseudo-temps. Le pseudo-temps repose sur une méthode de réduction de dimensions (« reversed-graph embedded technics ») (47) qui organise les échantillons suivant des trajectoires (**Fig. 5B**). Dans notre cas, chaque trajectoire représente la voie la plus proche pour aller du transcriptome d'un échantillon à un autre ; et le pseudo-temps obtenu est caractérisé par une succession de branches dont les valeurs représentent la variabilité du transcriptome au cours du développement embryonnaire pré-implantatoire (**Fig. 5C**). Pour valider la pertinence biologique de notre modèle, nous avons regardé la projection des cellules sur le pseudo-temps en nous basant sur leur stade et sur leur annotation de dissection. Comme attendu, le stade 8 cellules arrive en premier, suivi par le stade morula, puis le stade blastocyste. Toutes les cellules venant du TE mural sont dans la même branche, ce qui permet d'identifier cette branche comme étant celle du TE (**Fig. 5D**). Enfin, les projections de marqueurs humains connus (validés par immunofluorescence, (48)) des trois lignées cellulaires de l'embryon humain sont ségrégués dans trois branches différentes. L'expression de KLF17 (marqueur de l'épiblaste) est restreinte aux stades précoces de l'embryon et à la branche en haut à droite du pseudo-temps. SOX17 (marqueur de l'endoderme primitif) est restreint à la branche en haut à droite du stade blastocyste. GATA2 (marqueur du TE) est surexprimé au stade blastocyste et dans la branche TE (**Fig. 5E**).

Notre modèle de pseudo-temps est donc un outil très performant et novateur pour étudier le développement humain pré-implantatoire. L'expression des gènes et leur projection sur le pseudo-temps sont maintenant disponibles en ligne (<https://bird2cluster.univ-nantes.fr/demo/PseudoTimeUI/>).

Cependant, bien que le niveau d'expression d'un transcrit puisse donner une information biologiquement pertinente, l'effecteur biologique est dans la majorité des cas la protéine issue de la traduction du transcrit. Or l'expression de cette protéine peut être régulée par différents mécanismes post-transcriptionnels. Cela souligne l'intérêt, pour les travaux futurs, de combiner l'analyse transcriptionnelle avec l'analyse de l'expression protéique (49).

1.7. Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse est de caractériser le trophoctoderme humain pré-implantatoire en vue d'identifier des marqueurs spécifiques de la qualité embryonnaire en fécondation *in vitro*.

Le rapport s'articule en deux temps :

- 1) Etude de l'impact de la graduation morphologique du TE et de l'ICM sur le taux de naissances vivantes des blastocystes transférés frais à J5. Dans cette première partie, les objectifs sont de trouver quel est, parmi le TE et l'ICM, le paramètre morphologique le mieux corrélé au critère de jugement : taux de naissances vivantes, et de comparer ce résultat avec ceux connus dans la littérature scientifique.
- 2) Détermination de marqueurs de la lignée trophoblastique dans l'embryon humain pré-implantatoire, à partir :
 - de l'analyse des données du pseudo-temps,
 - de la réalisation d'immunofluorescence.

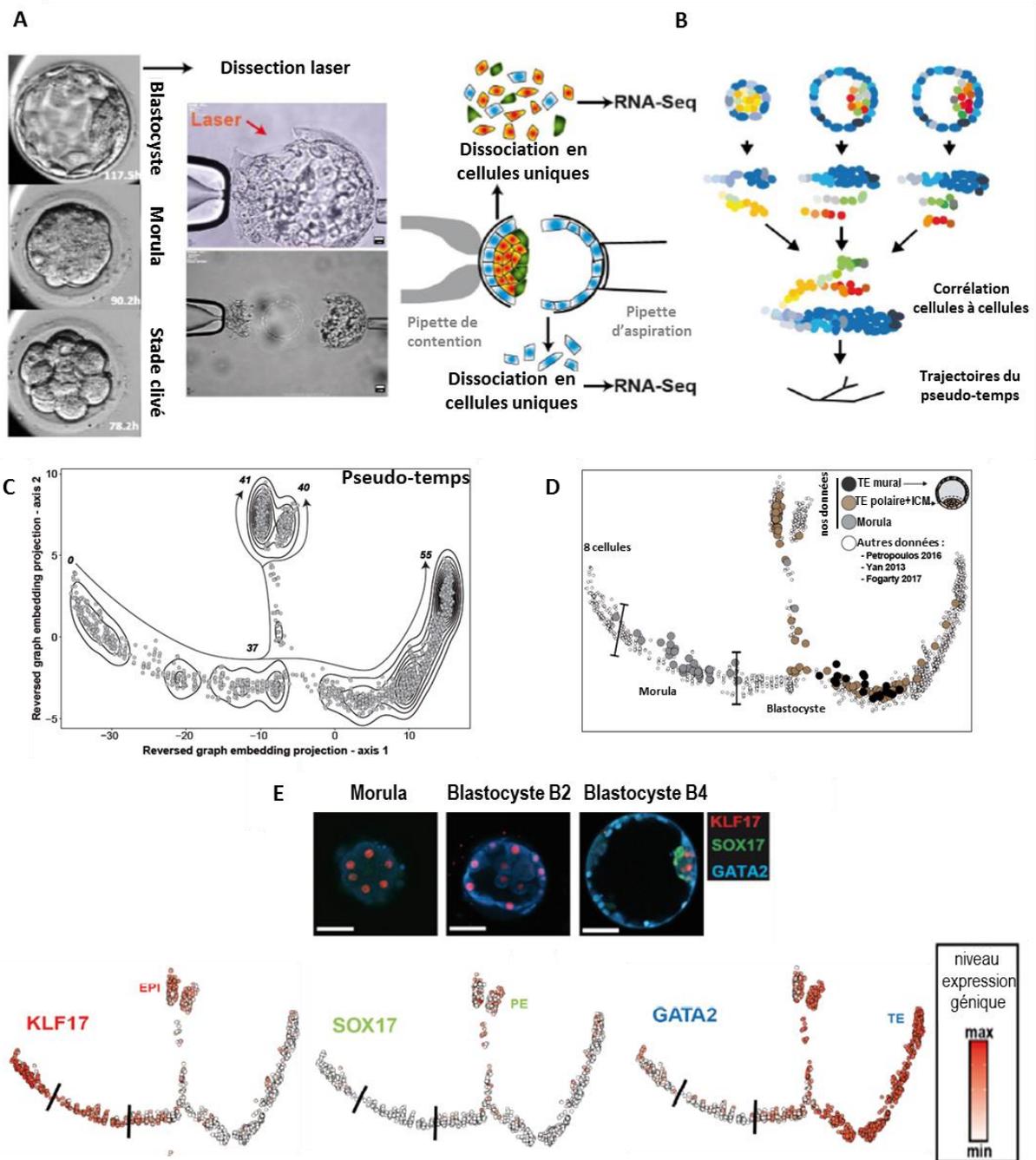


Figure 5. Pseudo-temps : modèle du développement humain pré-implantatoire

A. Protocole de dissection des embryons avant single-cell RNAseq. **B.** Schéma du principe d'analyse en pseudo-temps. Tous les profils transcriptomiques des cellules uniques analysées sont combinés pour créer les trajectoires les plus proches d'une cellule à une autre. **C.** Projection des échantillons de scRNAseq par application de Monocle2. La densité de cellules est schématisée par les courbes de densité. Les valeurs du pseudo-temps représentent l'amplitude de variation le long d'une trajectoire. **D.** Projection des stades et des annotations de dissection pour chaque cellule sur le pseudo-temps. **E.** Expression de marqueurs des lignées de l'embryon humain en immunofluorescence et par projection sur le pseudo-temps. Notes : EPI = épiblaste, PE = endoderme primitif, TE = trophoctoderme.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel et méthodes relatifs à l'étude de l'impact de la gradation morphologique du blastocyste

2.1.1 Population

Critères d'inclusion

Tous les cycles de FIV-ICSI réalisés, entre le 1^{er} janvier 2013 et le 1^{er} avril 2017, dans le centre de Biologie de la Reproduction de l'hôpital universitaire de Nantes en France, avec transfert mono-embryonnaire à J5 après culture dans l'Embryoscope® (Vitrolife A/S, Aarhus, Danemark) ont été analysés de façon rétrospective.

Les données relatives aux couples pris en charge incluent : la durée d'infertilité, les causes et le type d'infertilité, les antécédents de prise en charge dans un centre clinico-biologique d'AMP. Sont compris sous le terme « antécédents de prise en charge » : les stimulations simples, les inséminations intra-utérines, le rang de la demande, le rang de la stimulation et le rang de la ponction pour la tentative analysée.

Critères d'exclusion

Les transferts d'embryons congelés ont été exclus de l'analyse. Il en est de même pour les transferts frais mono-embryonnaires à J5 pour des embryons avec une indication de dépistage pré-implantatoire (DPI) ou issus d'un don d'ovocytes (**Fig. 6**).

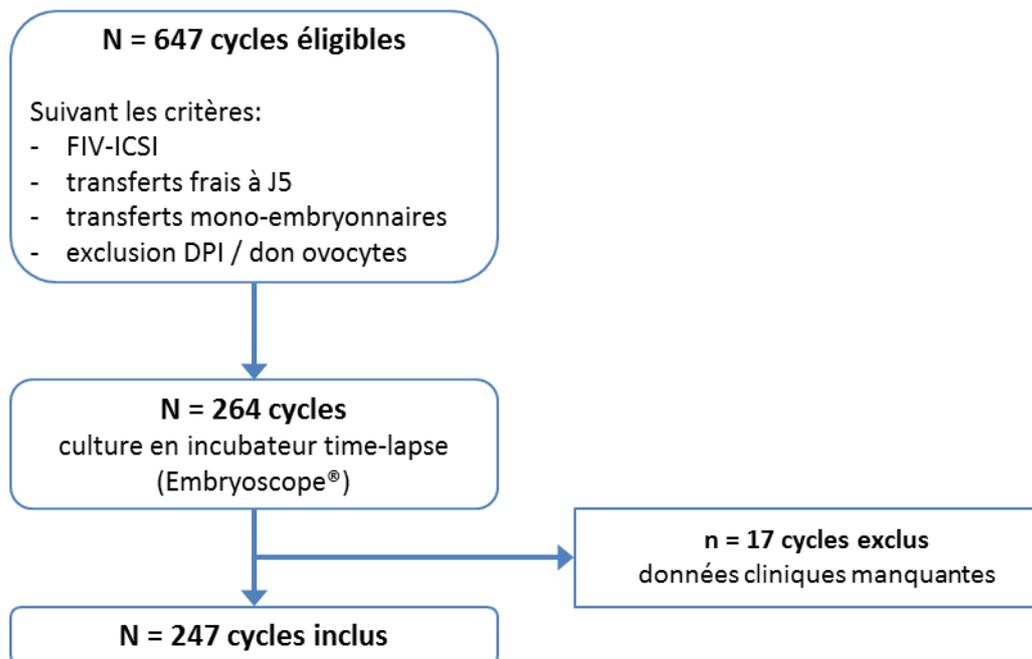


Figure 6. Diagramme de répartition des cycles FIV-ICSI inclus dans l'étude

2.1.2 Protocole de stimulation ovarienne et ponction des ovocytes

Tous les cycles ont été réalisés suivant un protocole de stimulation antagoniste, précédé ou non de la prise d'œstradiol (Provames®). La dose initiale de gonadotrophines (FSH recombinantes ou urinaires, HMG ou corifollitropine) variait de 75UI à 525UI. Elle était déterminée en fonction de l'âge de la patiente, de la fonction ovarienne et de la réponse à de précédents cycles de stimulation hormonale. Au cours du traitement, les doses des gonadotrophines étaient ajustées en fonction de la croissance folliculaire contrôlée par des échographies transvaginales et des dosages hormonaux (LH, œstrogène, progestérone). L'antagoniste de la GnRH (Orgalutran®, Cerotide®) était ajouté à la dose de 0,25mg/j aux alentours du 6^{ème} jour. Lorsque l'échographie montrait au moins trois follicules de plus de 17mm de diamètre, le déclenchement de l'ovulation était réalisé par l'injection d'hCG recombinante (Ovitrelle® 250µg) 34 à 36 heures avant la ponction ovarienne. Les complexes cumulo-ovocytaires étaient ponctionnés dans le milieu IVF médium® tempéré à 37°C.

2.1.3 Protocole de culture des embryons à J5

Les complexes cumulo-ovocytaires étaient isolés et rincés en G-IVF medium® (Vitrolife) puis incubés à 37°C dans des boîtes 4 puits en condition d'hypoxie : 5% d'O₂ et 6% de CO₂. Après décoronisation des ovocytes avec de la hyaluronidase (Hyase 10X®, Origio), les ovocytes matures (MII) étaient micro-injectés. L'ICSI était réalisée sous microscope inversé équipé d'une platine chauffante et d'un micro-manipulateur. Les spermatozoïdes étaient placés dans du G-IVF® ou une solution de polyvinylpyrrolidone (PVP®) en vue de l'ICSI. Dans la même boîte, les ovocytes matures étaient placés en microgouttes de G-IVF® et injectés. Après l'injection les ovocytes étaient placés en boîtes EmbryoSlide® (Vitrolife) et cultivés en système time-lapse Embryoscope® (Vitrolife) en milieux séquentiels G1-plus® / G2-plus® sous huile jusqu'au jour du transfert. Les conditions de culture étaient : 37°C, hypoxie : 5% d'O₂ et 6% de CO₂. En cours de culture, les embryons n'étaient sortis de l'Embryoscope® qu'au moment du changement de milieu à J3.

2.1.4 Evaluation des embryons en système time-lapse Embryoscope®

Grâce au système time-lapse TLM Embryoscope®, la lecture des embryons a été réalisée quotidiennement en respectant les horaires de l'évaluation morphologique des embryons préconisés par le consensus d'Istanbul ESHRE (7). Elle s'attache à la recherche :

- des signes de fécondation à 17±1h après l'injection, caractérisés par la présence des deux pronuclei,
- de la syngamie des pronuclei à 23±1h post-injection,
- des signes de clivage précoce à 26±1h post-injection.

La lecture de la morphologie des embryons était réalisée à $92\pm 2h$ à J4 et $116\pm 2h$ à J5.

Critères morphologiques à J5 (stade blastocyste)

Le référentiel utilisé pour la graduation des embryons à J5 est la classification de Gardner (12) (**Annexe.1**). Les blastocystes sont évalués sur trois contingents différents :

- le développement du blastocyste tenant compte de l'expansion ou de l'éclosion du blastocyste. Gradués de 1 : blastocyste non expansé avec début de cavitation, à 6 : blastocyste totalement éclos,
- la qualité de la masse cellulaire interne (ICM). Graduée de A : ICM compacte, à C : absence d'ICM,
- la qualité du trophectoderme (TE). Graduée de A : TE cellulaire avec un aspect festonné des bords, à C : absence de TE.

2.1.5 Définitions des critères de jugement

Cycle :

Dans le cadre de ce mémoire un cycle est défini par une tentative ayant abouti à un transfert frais mono-embryonnaire à J4 ou J5.

Taux de naissances vivantes :

La naissance vivante est définie par la délivrance complète d'un nouveau-né après 22 semaines de gestation (SG). Le taux de naissances vivantes est défini par le nombre de naissances vivantes rapporté pour 100 cycles (50).

Taux d'implantation :

Le taux d'implantation correspond au nombre de sacs gestationnels observé à l'échographie, (dans cette étude, à 6 semaines de développement), divisé par le nombre d'embryons transférés (usuellement exprimé en pourcentage) (50).

2.1.6 Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel PRISM4® (Softzare, La Jolla, CA, USA) et le logiciel Xlstat® (Addinsoft, USA). Pour les comparaisons de moyennes et de proportions les tests de Student, du Chi² et de Fisher ont été utilisés lorsqu'ils étaient appropriés. Pour l'analyse de la corrélation de variables, des tests de régression logistique univariée et multivariée ont été réalisés. Les variables étudiées en régression univariée ont été retenues dès lors qu'il existait une p-valeur < 0,1 en analyse de comparaison de moyennes ou de proportions ou sur leur pertinence clinique (reconnue dans la littérature). Les variables ayant une p-valeur < 0,05 dans l'analyse univariée ou les valeurs ayant une pertinence clinique

reconnue dans la littérature ont été incluses secondairement dans les analyses multivariées ou « stepwise ». Une p-valeur (p) $<0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

Toutes les données de l'étude ont été extraites de la base de données locale Médifirst® et déclarées auprès de la CNIL. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé pour l'utilisation anonyme de leurs données dans le cadre de la recherche. Le protocole de l'étude a été validé par le comité d'éthique local.

2.2. Matériel et méthodes relatifs à la détermination de marqueurs de la lignée trophoblastique dans l'embryon humain pré-implantatoire

2.2.1. Embryons humains pré-implantatoires

Les embryons analysés sont des embryons surnuméraires donnés à la recherche après abandon du projet parental de couples ayant été suivis en AMP. Ils répondent aux exigences relatives au don d'embryons pour la recherche en France. L'autorisation RE13-010 a été délivrée par l'agence de la biomédecine (ABM) pour la réalisation de ce projet. Tous les embryons pré-implantatoires utilisés pour ce travail ont été obtenus et cultivés dans le service de Biologie de la Reproduction du centre hospitalo-universitaire de Nantes, en France. Ce centre est autorisé par l'ABM (autorisation AG110126AMP) à réaliser la conservation d'embryons dans le cadre de la recherche. Les embryons utilisés étaient initialement issus d'une prise en charge en AMP avec pour finalité un projet parental. Ils n'étaient donnés à la recherche qu'après abandon volontaire du projet parental par les deux membres du couple ou que si, dans le cadre du DPI, l'embryon était atteint. Le consentement au don des embryons pour la recherche devait être consigné par écrit pour les deux membres du couple pris en charge en AMP, après avoir reçu une information claire et adaptée au sujet du projet de recherche conformément au code de pratique HFEA. Aucune rémunération n'était perçue par les couples qui donnaient leurs embryons à la recherche. Les analyses moléculaires étaient réalisées sur les embryons en accord avec le « embryo research oversight committee » et avec les recommandations de « The International Society for Stem Cell Research » (ISSCR).

2.2.2. Culture des embryons humains pré-implantatoires

Les embryons humains étaient tous cryopréservés et réchauffés suivant les protocoles établis par les fournisseurs :

- Vitrolife : RapidWarmCleave ou RapidWarmBlast, pour les embryons vitrifiés,
- Cook Medical Sydney IVF Thazing kit, pour les embryons cryopréservés en congélation lente.

Les embryons humains, au stade embryons clivés ou au stade blastocyste étaient déposés dans des boîtes de culture de 12 puits (Vitrolife : Embryoslide Ibidi) pour un nombre de jours de culture variant de 1 à 3 jours, dans un milieu non séquentiel (Vitrolife : GTL), sous huile (Origio : Liquid Paraffin). La culture était faite en incubateur time-lapse (Vitrolife : Embryoscope) à 37°C avec 5% d'O₂ et 6% de CO₂.

2.2.3. Acquisition des données des embryons humains en incubateur time-lapse

Les embryons étaient cultivés dans l'Embryoscope® (Unisense Fertilitech®), un incubateur tri-gaz équipé d'un microscope avec caméra qui permet un suivi rapproché de la cinétique de développement des embryons. Les images sont réalisées toutes les 15 minutes dans sept plans focaux avec un montage optique à modulation de contraste de Hoffman (HMC) et une LED de 635 nm pour source lumineuse. La résolution de la caméra est de 1280x1024 pixels. L'annotation du développement de chaque embryon était réalisée par deux biologistes entraînés suivant les modalités décrites par Ciray et *al.* (51), afin d'avoir une variabilité inter-opérateur la plus faible possible. L'amincissement de la zone pellucide (ZP) était mesuré en deux points opposés de l'embryon. Le tM référait à la morula compactée. Au stade blastocyste, le tSB était défini par le début de cavitation, le tB correspondait à un blastocyste expansé juste avant que la ZP ne s'affine, le tEB était caractérisé par un blastocyste expansé dont la ZP était amincie de 50% de sa valeur initiale. Etaient aussi annotées : les contractions et le début de l'éclosion du blastocyste.

2.2.4. Séquençage ARN en cellules uniques (sc-RNAseq)

Les cellules ont été isolées manuellement à partir des embryons humains, placées dans 5µL de tampon de lyse (1 :500 Phusion buffer, NEB ; 1/20 RNASE out, Life Technologies) et congelées à -80°C. La librairie SmartSeq2 est préparée suivant le protocole SmartSeq2. L'ARN total est purifié. Les Poly(A)⁺ mRNA sont convertis en cDNA qui sont ensuite amplifiés puis séquencés. Ce protocole SmartSeq2 est adapté à l'analyse d'un faible nombre de cellules.

2.2.5. Immunofluorescence (IF) des embryons humains

A différents stades de développement : morula, B1, B2, B3, B4, B5 ou B6, les embryons étaient fixés au contact d'une solution de 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 5 minutes à température ambiante puis lavés dans du PBS/BSA. Les embryons étaient perméabilisés puis stabilisés dans une solution IF Buffer (IF Buffer : PBS 0.2% Triton, 10% FBS) pendant

60 minutes à température ambiante. Les embryons étaient mis à incuber avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C. L'incubation avec l'anticorps secondaire durait 2 heures à température ambiante avec un contre-marquage au DAPI. Les anticorps secondaires et primaires étaient utilisés aux dilutions indiquées en **Annexe. 2**.

Un microscope confocal à objectif minimum 20x était utilisé pour l'acquisition des images, avec des sections de plan de 2µm d'épaisseur. L'exploitation des IF était effectuée avec le logiciel : Fiji (<http://fiji.sc>) or Volocity visualization software et le compte des noyaux cellulaires avec le logiciel Volocity. Cette étape a été réalisée avec la collaboration de Sophie Loubersac (interne en biologie de la reproduction effectuant son stage de M2 recherche dans l'équipe du Dr Laurent David).

3. Résultats

3.1. Etude de l'impact de la gradation morphologique du blastocyste

3.1.1. Caractéristiques de la population

Dans cette étude, 247 cycles avec un transfert frais à J5 mono-embryonnaire après culture en système time-lapse ont été inclus (**Fig. 6**). Le taux de naissances vivantes est de 32,8% ce qui correspond à 81 naissances vivantes.

Les caractéristiques démographiques des couples de patients pris en charge sont statistiquement différentes entre les bras « naissances vivantes » et « pas de naissance vivante » pour : la valeur de l'AMH ($5,0 \pm 4,5\text{ng/mL}$ vs $3,9 \pm 2,7\text{ng/mL}$ respectivement ; $p=0,0231$) et le type d'infertilité (l'infertilité secondaire : 43 (53,1%) vs 58 (34,9%) respectivement ; $p=0,0065$). Il est à noter qu'il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne l'âge maternel, ni en ce qui concerne les causes d'infertilité (**Table. 2**). Les antécédents d'AMP ne sont pas statistiquement différentes pour les couples quelle que soit l'issue du transfert. Il en est de même pour les caractéristiques de la stimulation ovarienne incluant : la durée de la stimulation, les doses de gonadotrophines initiales et totales administrées, le bilan hormonal et la mesure de l'épaisseur de l'endomètre le jour du déclenchement (**Table. 3**). En considérant les caractéristiques des tentatives, seul le nombre de blastocystes entre les transferts ayant abouti à une naissance vivante et ceux n'ayant pas abouti à une naissance vivante ($3,6 \pm 2,5$ vs $3,0 \pm 1,8$; $p=0,0199$) est statistiquement différent (**Table. 4**).

Table 2. Caractéristiques démographiques des cycles des transferts en fonction de l'issue

	Naissances vivantes	Pas de naissance vivante	p-valeur	Significativité
Nombre total de cycles	81	166		
Caractéristiques des patientes				
Age maternel (ans)	31,5 ± 3,9	31,7 ± 4,4	0,7386	ns
BMI maternel (kg/m ²)	23,2 ± 4,5	24,4 ± 5,2	0,0831	ns
Tabagisme actif	16 (19,8%)	29 (17,5%)	0,3169	ns
Tabagisme sévère	23 (28,4%)	37 (22,3%)	0,2935	ns
Réserve ovarienne				
AMH (ng/mL)	5,0 ± 4,5	3,9 ± 2,7	0,0231	*
CFA	22 ± 10,8	21 ± 11,0	0,5999	ns
Caractéristiques des patients				
Age paternel (ans)	34,7 ± 5,8	33,7 ± 4,8	0,1658	ns
Caractéristiques de l'infertilité du couple				
Durée infertilité (ans)	2,6 ± 2,4	3,1 ± 2,3	0,1060	ns
Infertilité primaire	35 (43,2%)	93 (56,0%)	0,0585	ns
Infertilité secondaire	43 (53,1%)	58 (34,9%)	0,0065	**
Infertilité primo-secondaire	3 (3,7%)	15 (9,0%)	0,1917	ns
Causes féminines de l'infertilité				
Absence de facteurs féminins	21 (25,9%)	38 (22,9%)	0,5995	ns
Ovulation normale	21 (25,9%)	44 (26,5%)	0,9226	ns
WHO I	0 (0,0%)	2 (1,2%)	1,0000	ns
WHO IIa	36 (44,4%)	91 (54,8%)	0,1256	ns
WHO IIb	16 (19,8%)	20 (12,0%)	0,1072	ns
WHO III	6 (7,4%)	9 (5,4%)	0,5756	ns
Endométriose	1 (1,2%)	8 (4,8%)	0,2784	ns
Tubaire	4 (4,9%)	10 (6,0%)	1,0000	ns
Autres causes féminines	0 (0,0%)	1 (0,6%)	1,0000	ns
Causes masculines de l'infertilité				
Absence de facteurs masculins	21 (25,9%)	30 (18,1%)	0,1523	ns
Azoospermie excrétrice	2 (2,5%)	10 (6,0%)	0,3465	ns
Azoospermie sécrétoire	3 (3,7%)	3 (1,8%)	0,3969	ns
OATS	53 (65,4%)	115 (69,3%)	0,5430	ns
Post-chimiothérapie	0 (0,0%)	4 (2,4%)	0,3061	ns
Problème sexologique	0 (0,0%)	1 (0,6%)	1,0000	ns
Autres causes masculines	5 (6,2%)	10 (6,0%)	1,0000	ns

Notes:

- Les valeurs continues sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- BMI: indice de masse corporelle – AMH: hormone anti-müllérienne – CFA: compte des follicules antraux

– WHO: classification des dysovulations suivant l'organisation mondiale de la santé – OATS: oligo-asthénospermie sévère.

Table 3. Caractéristiques de la stimulation ovarienne des transferts en fonction de l'issue

	Naissances vivantes	Pas de naissance vivante	p-valeur	Significativité
Nombre total de cycles	81	166		
Antériorités d'AMP				
Stimulations simples	10 (12,3%)	14 (8,4%)	0,3298	ns
Inséminations intra-utérines	11 (13,6%)	13 (7,8%)	0,1521	ns
Numéro de la demande				
1ère demande	64 (79,0%)	141 (84,9%)	0,2444	ns
2ème demande	16 (19,8%)	25 (15,1%)	0,3521	ns
3ème demande	1 (1,2%)	0 (0,0%)	0,3279	ns
Antériorités de stimulation				
Aucune	35 (43,2%)	66 (39,8%)	0,6045	ns
1 stimulation	25 (30,9%)	56 (33,7%)	0,6519	ns
2 stimulations	12 (14,8%)	28 (16,9%)	0,6810	ns
3 stimulations	6 (7,4%)	10 (6,0%)	0,6784	ns
4 stimulations	3 (3,7%)	4 (2,4%)	0,6865	ns
5 stimulations	2 (2,1%)	2 (1,2%)	1,0000	ns
Numéro de ponction				
1ère ponction	44 (54,3%)	75 (45,2%)	0,1771	ns
2ème ponction	23 (28,4%)	62 (37,3%)	0,1643	ns
3ème ponction	8 (9,9%)	18 (10,8%)	0,8162	ns
4ème ponction	4 (4,9%)	7 (4,2%)	0,7536	ns
5ème ponction	2 (2,5%)	2 (1,2%)	0,5993	ns
6ème ponction	0 (0,0%)	2 (1,2%)	1,0000	ns
Stimulation ovarienne				
Durée de la stimulation (j)	9,4 ± 1,4	9,5 ± 1,5	0,6124	ns
Dose initiale en gonadotrophines (UI/j)	225 ± 93,1	250 ± 104,5	0,0640	ns
Dose totale en gonadotrophines (UI)	2198 ± 967,8	2447 ± 1053	0,0751	ns
Au jour du déclenchement				
Taux de Pg (ng/mL)	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,1372	ns
Dosage d'E2 (pg/mL)	1950 ± 845	1962 ± 814	0,9204	ns
Dosage de LH (UI/mL)	1,9 ± 1,3	2,0 ± 1,9	0,5146	ns
Epaisseur de l'endomètre (cm)	9,3 ± 1,5	9,0 ± 1,8	0,2568	ns

Notes:

- Les valeurs continues sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- AMP: assistance médicale à la procréation – Pg: progesterone – E2: Œstrogène – LH: hormone lutéinisante.

Table 4. Caractéristiques des tentatives des transferts en fonction de l'issue

	Naissances vivantes	Pas de naissance vivante	p-valeur	Significativité
Nombre total de cycles	81	166		
Origine des spermatozoïdes				
ICSI avec sperme frais	72 (88,9%)	143 (86,1%)	0,5465	ns
ICSI avec sperme congelé	6 (7,4%)	7 (4,2%)	0,2918	Ns
ICSI avec BT	2 (2,5%)	16 (9,6%)	0,0646	ns
ICSI avec sperme de donneur	1 (1,2%)	0 (0,0%)	0,3279	ns
Caractéristiques du sperme				
[spermatozoïdes](M/mL)	2,06 ± 2,21	2,44 ± 3,42	0,3817	ns
[spermatozoïdes mobiles progressifs](M/mL)	0,98 ± 2,52	0,99 ± 1,65	0,9768	ns
Caractéristiques de l'ICSI				
Nbe d'ovocytes ponctionnés	11,7 ± 4,5	11,5 ± 4,7	0,6877	ns
Nbe d'ovocytes matures	9,0 ± 4,0	8,2 ± 3,3	0,1220	ns
Nbe d'ovocytes injectés	9,0 ± 3,8	8,1 ± 3,2	0,4021	ns
Nbe de 2PN à 25h	1,4 ± 1,6	1,5 ± 2,0	0,8252	ns
Nbe de OPN à 25h	2,9 ± 2,8	2,9 ± 2,4	0,9519	ns
Nbe de 2PN à J1	5,3 ± 2,7	4,7 ± 2,6	0,0837	ns
Nbe de zygotes ≥ à 3PN à J1	0,2 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,5891	ns
Nbe total d'embryons J3	5,5 ± 2,7	4,9 ± 2,4	0,0845	ns
Nbe d'embryons en CP	4,8 ± 2,6	4,3 ± 2,1	0,1078	ns
Nbe de blastocystes	3,6 ± 2,5	3,0 ± 1,8	0,0199	*

Notes:

- Les valeurs continues sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- AMP: assistance médicale à la procréation – BT: biopsie testiculaire – []: concentration – Nbe: nombre – PN: pronucleus – CP: culture prolongée.

La population d'étude a été secondairement restreinte aux embryons ayant une gradation de l'ICM et du TE selon la classification de Gardner (12) (**Annexe. 1**) pour étudier l'impact de la gradation de ces deux paramètres sur le taux de naissances vivantes.

Cette population correspond à l'inclusion de 201 cycles avec un transfert frais à J5 mono-embryonnaire après culture en système time-lapse. Le taux de naissances vivantes est de 36,8% ce qui correspond à 74 naissances vivantes.

Les caractéristiques démographiques des couples de patients pris en charge sont statistiquement différentes entre les bras « naissances vivantes » et « pas de naissance vivante » uniquement pour le type d'infertilité : l'infertilité primaire (30 (40,5%) vs 70 (55,1%) respectivement ; p=0,0462) et l'infertilité secondaire (42 (56,8%) vs 46 (36,2%) respectivement ; p=0,0046) (**Annexe. 3A**). Les antécédents d'AMP et les données relatives à la stimulation ovarienne ne sont pas statistiquement différentes pour les couples quelle que soit l'issue du transfert (**Annexe. 3B**). En considérant les caractéristiques des tentatives,

seul le nombre d'ovocytes fécondés (nombre de 2PN à J1) entre les transferts ayant abouti à une naissance vivante et ceux n'ayant pas abouti à une naissance vivante ($5,5 \pm 2,7$ vs $4,8 \pm 2,5$; $p=0,0409$) est statistiquement différent (**Annexe. 3C**).

3.1.2. Comparaison des taux de naissances vivantes en fonction de la morphologie de l'embryon

Considérant le critère de jugement « naissances vivantes », les taux de naissances vivantes sont significativement différents en fonction de l'expansion de l'embryon ($p=0,0248$) (**Fig. 7A**) et du grade du TE ($p=0,0009$) (**Fig. 7C**), à contrario ils ne sont pas significativement différents en fonction du grade de l'ICM ($p=0,061$) (**Fig. 7B**). Pour réaliser cette analyse il a été nécessaire de constituer 3 groupes : un premier groupe avec les stades morula, B1, B2, un second groupe avec les embryons ayant une ICM graduée B ou C et un troisième groupe avec les embryons ayant un TE gradué B ou C afin que les effectifs répondent aux conditions d'application des tests statistiques.

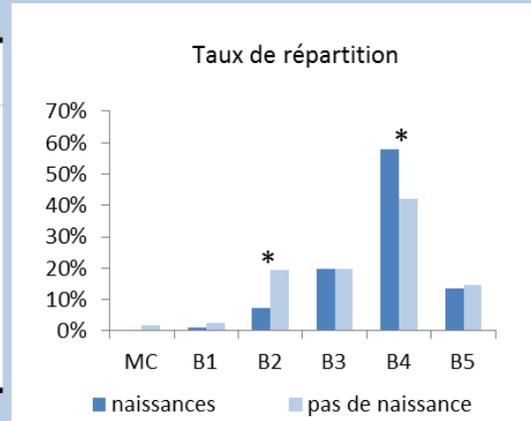
L'analyse de la répartition des embryons en fonction de leur morphologie et de l'issue clinique « naissances vivantes » montre qu'il existe une différence statistiquement significative pour les embryons aux stades B2 (6 (7,4%) vs 32 (19,3%) ; $p=0,0152$) et B4 (47 (58,0%) vs 70 (42,2%) ; $p=0,0191$) (**Fig. 7A**) et pour les embryons avec une ICM grade B (10 (13,5%) vs 33 (26,0%) ; $p=0,0376$) (**Fig. 7B**) ou un TE grade A (59 (79,7%) vs 72 (56,7%) ; $p=0,0009$) et B (15 (20,3%) vs 52 (40,9%) ; $p=0,0027$) (**Fig. 7C**).

Les résultats sont comparables en ce qui concerne la comparaison des taux d'implantation en fonction de la morphologie de l'embryon (**Annexe. 4**), à ceci près qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative sur l'implantation quel que soit le grade de l'ICM (**Annexe. 4B**).

Figure 7. Analyse descriptive de la morphologie embryonnaire et des naissances vivantes

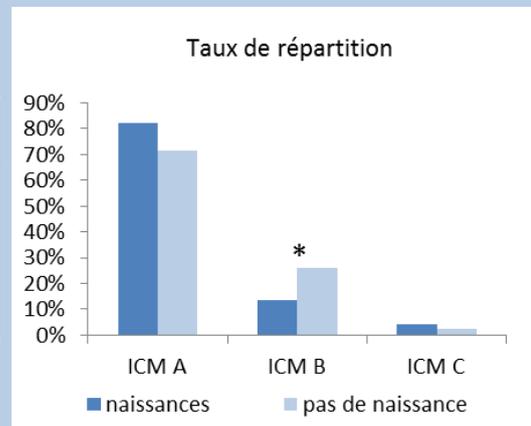
A. Comparaison des naissances vivantes en fonction de l'expansion des blastocystes

	Naissances vivantes	p-valeur	Pas de naissance vivante
Effectif	81 (32,8%)		166 (67,2%)
MC	0 (0,0%)	0,0248 *	3 (1,8%)
B1	1 (1,2%)		4 (2,4%)
B2	6 (7,4%)		32 (19,3%)
B3	16 (19,8%)		33 (19,9%)
B4	47 (58,0%)		70 (42,2%)
B5	11 (13,6%)		24 (14,5%)



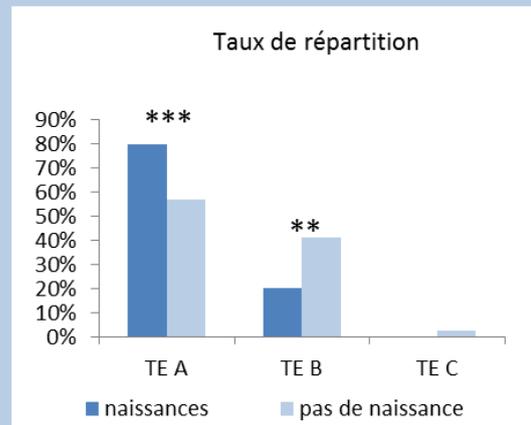
B. Comparaison des naissances vivantes en fonction du grade de l'ICM

	Naissances vivantes	p-valeur	Pas de naissance vivante
Effectif	74 (36,8%)		127 (63,2%)
ICM A	61 (82,4%)	0,061	91 (71,7%)
ICM B	10 (13,5%)		33 (26,0%)
ICM C	3 (4,1%)		3 (2,4%)



C. Comparaison des naissances vivantes en fonction du grade du TE

	Naissances vivantes	p-valeur	Pas de naissance vivante
Effectif	74 (36,8%)		127 (63,2%)
TE A	59 (79,7%)	0,0009 ***	72 (56,7%)
TE B	15 (20,3%)		52 (40,9%)
TE C	0 (0,0%)		3 (2,4%)



Notes:

- Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).
- La significativité est exprimée de la façon suivante: de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».
- MC = morula, B = blastocyste, ICM = masse cellulaire interne, TE = trophoctoderme.

3.1.3. Etude de la corrélation en fonction de l'issue clinique « naissances vivantes »

Analyse de régression logistique univariée

Dans cette étude, l'analyse de régression logistique univariée identifie quatre variables associées aux taux de naissances vivantes. En considérant les caractères morphologiques de l'embryon : expansion, grade de l'ICM et grade du TE, seule une corrélation du taux de naissances vivantes avec le grade du TE est mise en avant. La probabilité du taux de naissances vivantes est statistiquement diminuée pour les embryons avec un TE gradué B ou C par rapport à ceux avec un TE gradué A (OR=0,340 ; IC95% [0,177 – 0,655] ; p=0,001) (**Fig. 8A**). (En raison d'un faible nombre d'embryons transférés avec une ICM graduée C (n=3) ou un TE gradué C (n=3), ces embryons ont été regroupés, respectivement, avec les embryons de grade ICM B ou TE B). La durée d'infertilité, le type d'infertilité et la dose totale de gonadotrophines (FSH) sont également statistiquement corrélés au taux de naissances vivantes (**Fig. 8B**). Le taux de naissances vivantes décroît lorsque la durée d'infertilité augmente (OR=0,863 ; IC95% [0,748 – 0,996] ; p=0,044). L'infertilité secondaire augmente significativement, de plus de deux fois, les taux de naissances vivantes par rapport à l'infertilité primaire (OR=2,031 ; IC95% [1,123 – 3,673] ; p=0,019). La dose totale de gonadotrophines (FSH) est statistiquement associée au taux de naissances vivantes (OR=0,373 ; IC95% [0,164 – 0,850] ; p=0,019). Les autres paramètres relatifs aux patients ou aux cycles n'étaient pas statistiquement corrélés au taux de naissances vivantes (**Annexe. 5**)

Analyse de régression logistique multivariée et « stepwise »

L'analyse de régression logistique multivariée permet d'évaluer indépendamment l'effet de l'expansion, de l'ICM et du TE sur le taux de naissances vivantes, en ajustant sur des paramètres connus comme facteurs de confusion : l'âge maternel et les antécédents de stimulation (23,24,55,61), la durée d'infertilité, le type d'infertilité et la dose totale de FSH. Seul le grade du TE est retrouvé significativement associé avec le taux de naissances vivantes (OR=0,339 ; IC95% [0,150 – 0,768] ; p=0,010) (**Fig. 8A**). Et seule l'infertilité secondaire reste un paramètre statistiquement confondant (OR=2,097 ; IC95% [1,072 – 4,104] ; p=0,031) (**Fig. 8B**). Ces résultats sont confirmés par l'analyse logistique « stepwise » avec une association statistiquement significative entre le grade du TE et le taux de naissances vivantes (OR=0,328 ; IC95% [0,167 – 0,642] ; p=0,001), ajustée sur le type d'infertilité (infertilité secondaire vs infertilité primaire : OR=2,173 ; IC95% [1,177 – 4,015] ; p=0,013) (**Fig. 9**).

Si on considère le taux d'implantation, l'analyse par régression logistique multivariée ne montre pas d'association statistiquement significative avec les paramètres morphologiques ; qu'il s'agisse de l'expansion, du grade de l'ICM ou du TE (**Annexe. 6**).

Figure 8. Etude de la corrélation en fonction de l'issue clinique « naissances vivantes »

A. Analyse de régression logistique univariée et multivariée de la morphologie des embryons et du taux de naissances vivantes

	Régression logistique univariée				Régression logistique multivariée			
	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité
Expansion								
B3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B4	1,356	[0,678 - 2,714]	0,389	ns	1,101	[0,515 - 2,354]	0,804	ns
B5	0,754	[0,863 - 2,175]	0,754	ns	0,537	[0,191 - 1,510]	0,239	ns
ICM								
A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B + C	0,565	[0,281 - 1,137]	0,109	ns	0,844	[0,349 - 2,040]	0,706	ns
TE								
A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B + C	0,340	[0,177 - 0,655]	0,001	**	0,339	[0,150 - 0,768]	0,010	**

B. Analyse de régression logistique univariée et multivariée du taux de naissances vivantes

	Régression logistique univariée				Régression logistique multivariée			
	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité
Âge maternel	1,015	[0,948 - 1,086]	0,676	ns	1,016	[0,936 - 1,103]	0,706	ns
Durée infertilité	0,863	[0,748 - 0,996]	0,044	*	0,900	[0,770 - 1,053]	0,190	ns
Type infertilité								
Primaire	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Secondaire	2,031	[1,123 - 3,673]	0,019	*	2,097	[1,072 - 4,104]	0,031	*
Primo-secondaire	0,386	[0,081 - 1,846]	0,233	ns	0,535	[0,097 - 2,953]	0,473	ns
N° stimulation								
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	0,798	[0,412 - 1,548]	0,505	ns	0,811	[0,394 - 1,670]	0,570	ns
≥ 3	0,948	[0,461 - 1,946]	0,883	Ns	1,097	[0,493 - 2,440]	0,821	ns
Dose FSH totale (UI)								
≤ 2000	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
≤ 2500	0,373	[0,164 - 0,850]	0,019	*	0,499	[0,205 - 1,211]	0,192	ns
≤ 3000	0,773	[0,326 - 1,836]	0,560	ns	0,975	[0,380 - 2,498]	0,915	ns
> 3000	0,689	[0,323 - 1,473]	0,337	ns	0,785	[0,334 - 1,842]	0,785	ns

Notes:

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- NA: non applicable, B: blastocyste, ICM: masse cellulaire interne, TE: trophoctoderme, N°: numéro, FSH: hormone folliculo-stimulante, UI: unité internationale.

Figure 9. Analyse de régression logistique « stepwise » en fonction des naissances vivantes

	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité
Type infertilité				
Primaire	NA	NA	NA	NA
Secondaire	2,173	[1,177 - 4,015]	0,013	*
Primo-secondaire	0,293	[0,087 - 2,091]	0,293	ns
TE				
A	NA	NA	NA	NA
B + C	0,328	[0,167 - 0,642]	0,001	**

Notes:

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- NA: non applicable, TE: trophoctoderme.

3.2. Détermination de marqueurs de la lignée trophoblastique dans l'embryon humain pré-implantatoire

3.2.1. Première différenciation de lignée TE/ICM chez l'Homme

La projection des cellules de chaque embryon sur le pseudo-temps, permet de relier le stade de développement des embryons aux événements moléculaires. Grâce aux annotations temporelles (jour embryonnaire et stade de développement suivant la classification de Gardner) des embryons de notre jeu de données, il est possible de déterminer quand a lieu l'engagement dans la première différenciation cellulaire chez l'Homme. Au cours de cette différenciation, les cellules s'engagent dans la lignée du TE ou dans la lignée de l'ICM. La distribution des embryons montre que cette première spécification de lignée a lieu au 5^{ème} jour embryonnaire (E5) qui correspond au stade du blastocyste non expansé (**Fig. 10**). En s'intéressant à la voie de signalisation HIPPO (**Fig. 3C**), qui est l'évènement moléculaire clé de la spécification du TE et de l'ICM chez la souris, on remarque que chez l'Homme:

- les cellules issues d'embryons humains Knocked Out (KO) pour le gène OCT4 (46) se différencient en cellules du TE ou de l'ICM. Mais elles n'atteignent pas les stades matures du TE ou de l'ICM, contrairement aux cellules contrôles « Cas9 Injected » de l'expérience (**Fig. 11A**),
- l'expression de Cdx2 est transitoire et retardée par rapport à la spécification du TE et de l'ICM (**Fig. 11B**).

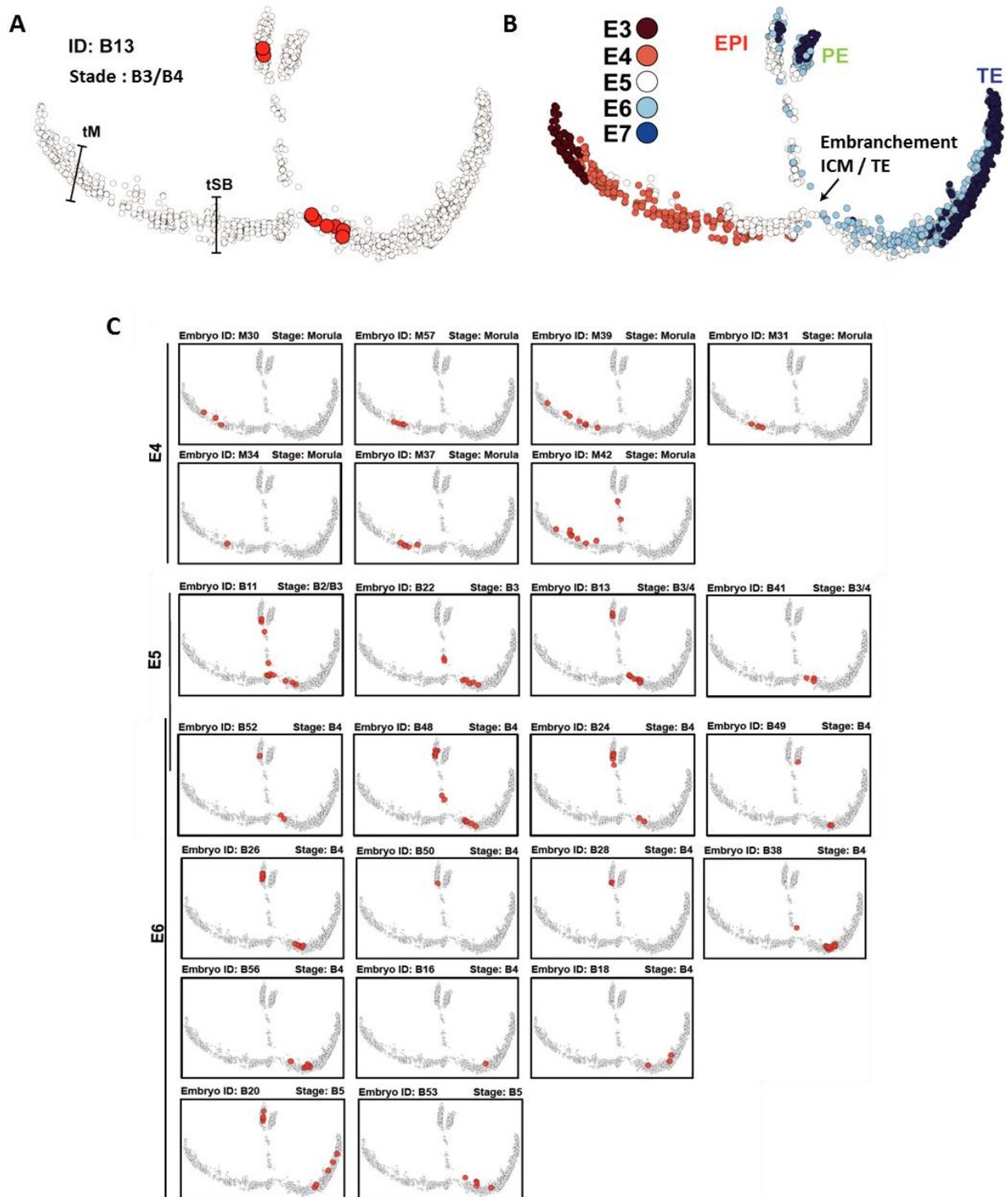


Figure 10. Projection des embryons sur le pseudo-temps

A. Association du stade morphocinétique d'un embryon avec les données transcriptomiques du pseudo-temps avec l'exemple de la projection de l'embryon B13 sur le pseudo-temps. **B.** Projection des jours de développement embryonnaire (E3 à E7) pour tous les échantillons du jeu de données. **C.** Projection des échantillons de notre propre jeu de données, avec annotation en système time-lapse. Notes: ID: identification, B: blastocyste, E: jour embryonnaire, tM: morula compactée, tSB: début de cavitation, ICM: masse cellulaire interne, EPI: épiblaste, PE: endoderme primitif, TE: trophectoderme.

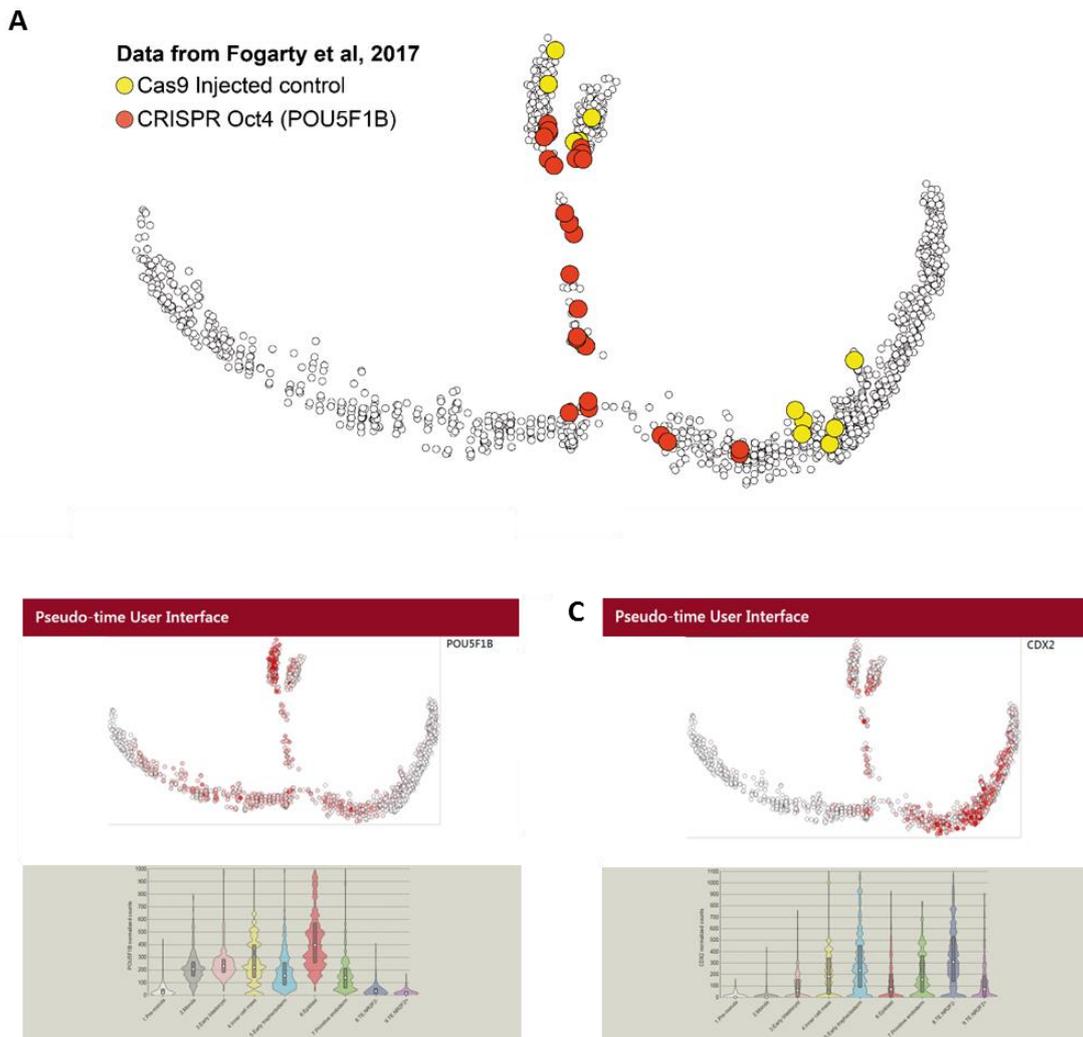


Figure 11. Projection des embryons KO OCT4 sur le pseudo-temps et interfaces Pseudo-time User

A. Projection des cellules uniques humaines issues des embryons KO OCT4 (en orange) ou de cellules contrôles (en jaune). Les échantillons proviennent du travail de l'équipe de Fogarty et *al.* 2018. **B-C.** Captures d'écran de l'interface Pseudo-time User chez l'Homme, pour deux gènes d'intérêt: POU5F1 (OCT4) (**B**) et CDX2 (**C**). Lien url: <https://bird2cluster.univ-nantes.fr/demo/PseudoTimeUI/>

3.2.2. Identification d'une signature du TE

Les cellules du TE de l'embryon humain se répartissent sur la « branche TE » du pseudo-temps suivant le jour embryonnaire, de E5 (au plus proche de l'embranchement ICM/TE) jusqu'à E7 (stade pré-implantatoire se rapprochant le plus du moment de l'implantation dans le jeu de données du pseudo-temps) (**Fig. 10B**). Au sein de cette branche, il existe une

séquence cinétique de l'expression des facteurs de transcription. Au stade de blastocyste précoce E5, le transcrite GATA3 est exprimé avant l'embranchement de la spécification de lignée ICM/TE, et son expression est secondairement restreinte au TE. L'expression des gènes des facteurs de transcription GATA2, DLX5 et NR2F2 est, quant à elle, séquentielle le long de la « branche TE » (**Fig. 12**). Ces observations supportent l'hypothèse selon laquelle les cellules se différencient puis s'engagent secondairement dans la « branche TE ». Ces cellules du TE évoluent d'un état « précoce » vers un état « tardif », plus propice à l'implantation.

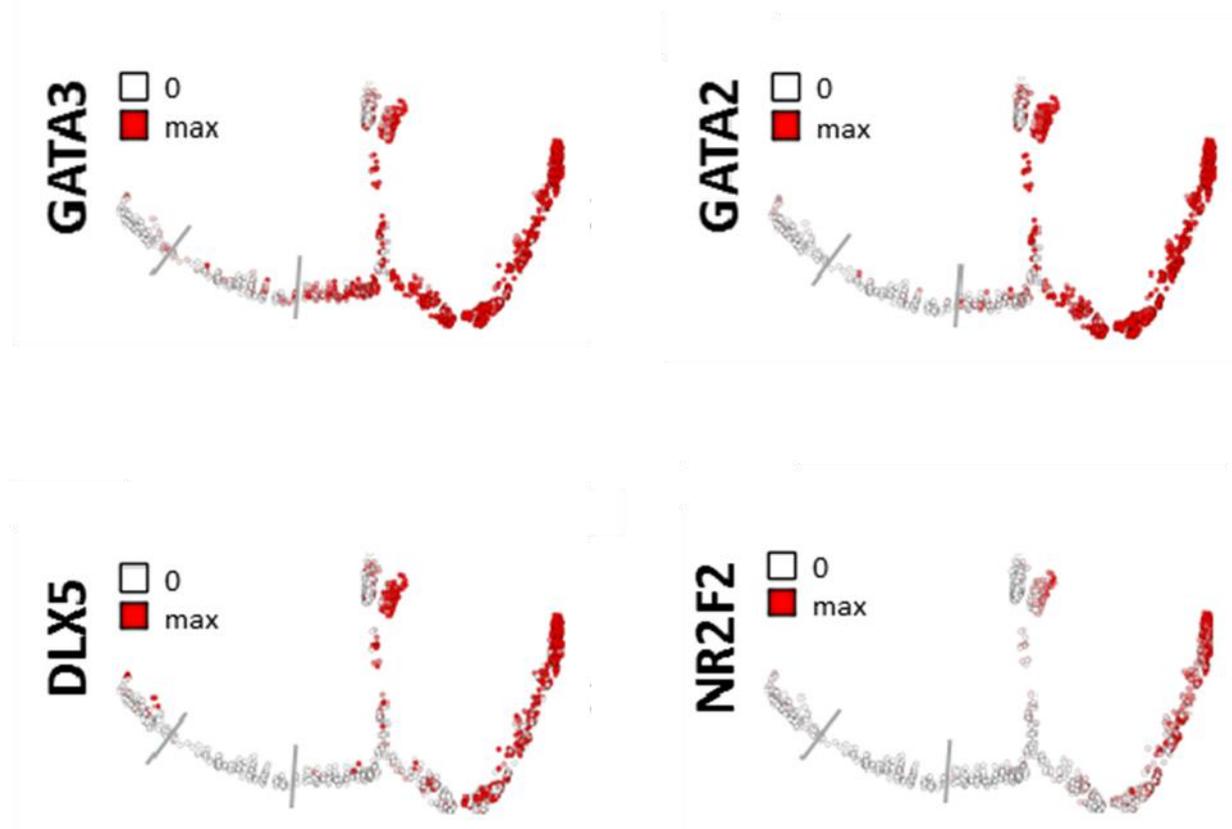


Figure 12. Expression génique des GATA3, GATA2, DLX5, NR2F2

Projection du niveau d'expression génique des facteurs de transcription: GATA3, GATA2, DLX5 et NR2F2 sur le pseudo-temps.

Le facteur de transcription NR2F2 est un marqueur d'intérêt car :

- c'est un facteur de transcription tardif, exprimé dans la « branche TE » du pseudo-temps après le stade B4/E6 (**Fig. 13A**). A ce stade les cellules du TE ont perdu leur plasticité (capacité à se dé-différencier et à s'engager dans la voie de différenciation de l'ICM) (52).

- NRFR2 est un inhibiteur du facteur de transcription POU5F1 (OCT4) impliqué dans le réseau de régulation de la pluripotence. Et NR2F2 est inhibé au moment de sa transcription par OCT4 ou de façon post-transcriptionnelle par le miARN miR-302 (**Fig. 13B**) (53).

La technique d'immunofluorescence permet d'analyser l'expression spatio-temporelle de protéines. Les immunofluorescences réalisées sur les embryons humains, montrent que la localisation du facteur de transcription NR2F2 est bien nucléaire et trophoblastique. Les cellules NR2F2+ co-localisent avec des cellules marquées GATA3 et GATA2, au stade B4, mais de nombreuses cellules GATA3+/GATA2+ sont NR2F2- (**Fig. 13C**). Le marquage des cellules NR2F2+ est en fait restreint aux cellules du TE polaire. Ces cellules du TE polaire, situées en regard de l'ICM, sont identifiables par l'absence de co-marquage avec NANOG (facteur de transcription spécifique de l'épiblaste dans l'ICM) (**Fig. 13D**). In fine, au stade de blastocyste tardif, il existe une expression différentielle du facteur de transcription NR2F2 au sein du TE qui ségrège en fonction du TE polaire et du TE mural.

L'approche par étude de la corrélation d'expression de gènes (WGCNA : Weighted Genes Co-expression Network Analysis) permet d'identifier des modules de gènes co-régulés et permet d'identifier le lien hiérarchique entre les différents gènes d'un même module. Au total, 8 modules de gènes ont été identifiés. Ils correspondent aux modules les plus fortement exprimés au cours du développement de l'embryon humain pré-implantatoire. La superposition des données du WGCNA avec celles du pseudo-temps permet de diviser la « branche TE » en trois stades de maturation (**Fig. 14A-C**) :

- un état pré-TE ou TE « précoce », caractérisé par l'expression des gènes du module GATA2. Ce module comprend les facteurs de transcription GATA3, CDX2, DLX3.
- un état TE.NR2F2-, caractérisé par une expression des gènes du module GATA2 concomitante de l'initiation de l'expression des gènes du module NR2F2. Le module NR2F2 comprend les facteurs de transcription TP63, TFAP2A, DLX5, PPARG.
- un état TE.NR2F2+ ou TE « tardif », caractérisé par une diminution de l'expression des gènes du module GATA2 et une surexpression des gènes du module NR2F2.

L'enrichissement fonctionnel des modules de gènes surexprimés dans la « branche TE » du pseudo-temps est essentiellement lié aux jonctions cellulaires pour le module GATA2, et lié à la stéroïdogénèse ovarienne pour le module NR2F2 (**Fig. 14D**).

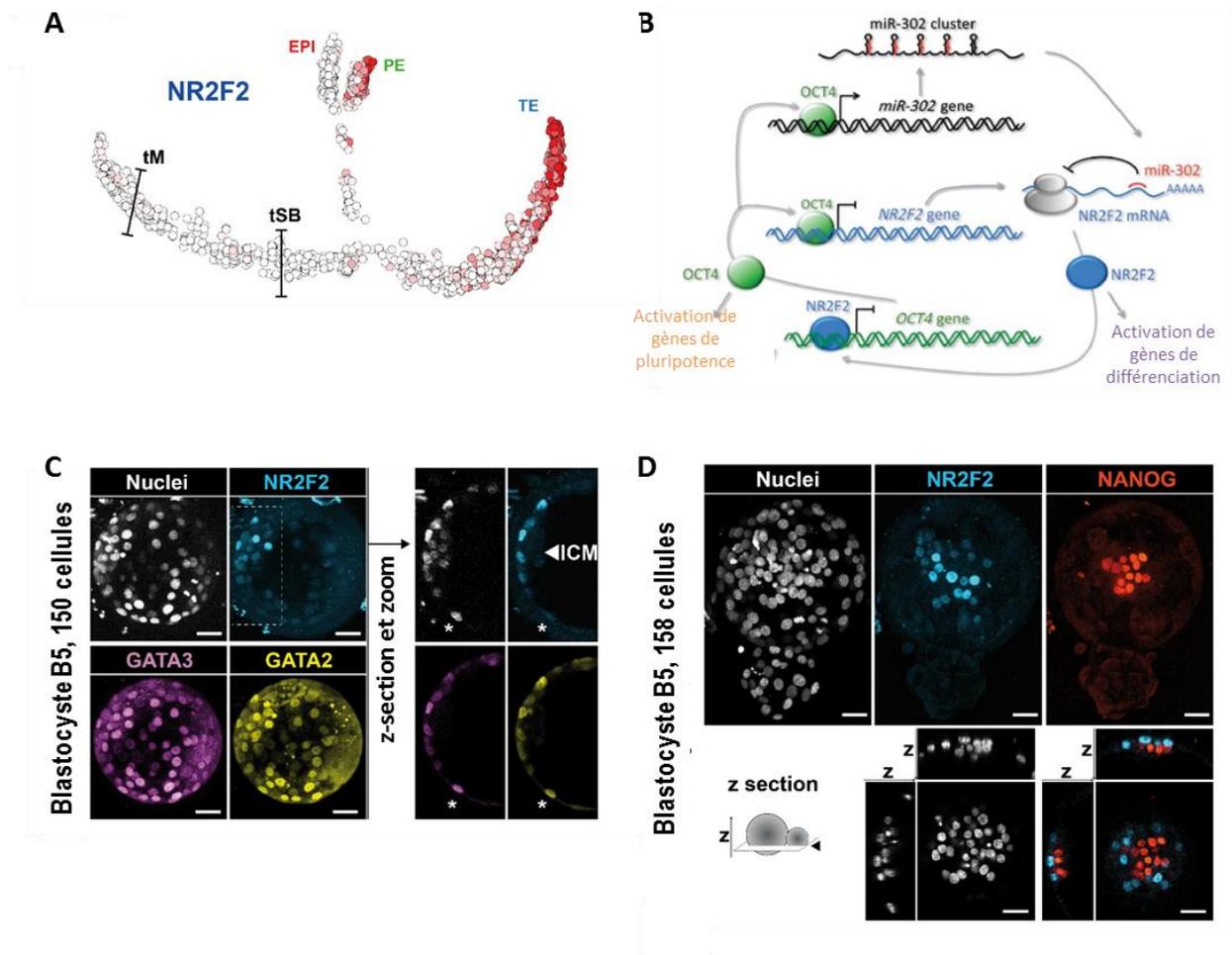


Figure 13. Identification d'un marqueur du TE mature : NR2F2

A. Projection du niveau d'expression de NR2F2 sur le pseudo-temps. **B.** Schéma des niveaux de régulation du réseau de pluripotence médiée par POU5F1 (OCT4)/NR2F2/miR-302. D'après Rosa et Brivanlou, 2011. **C-D.** Immunofluorescence de NR2F2 (cyan) avec des co-marquages au DAPI (blanc) et avec GATA2 (jaune) et GATA3 (violet) au stade B4 (**D**) ou avec NANOG (rouge) au stade B5 (**C**). L'astérisque marque une cellule NR2F2 négative et GATA3 / GATA2 positive. Echelle = 47µm. Notes: tM: morula compacte, tSB: début de cavitation, ICM: masse cellulaire interne, EPI: épiblaste, PE: endoderme primitif, TE: trophoctoderme, nuclei: noyaux.

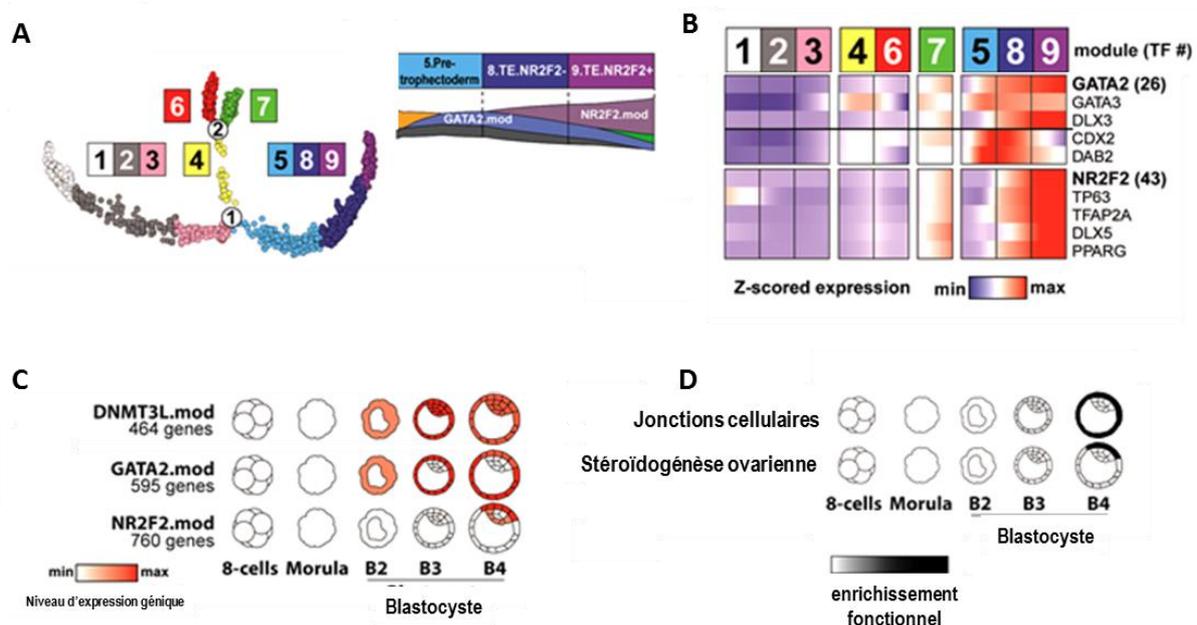


Figure 14. Séquence spatio-temporelle des évènements de la maturation du TE pré-implantatoire humain

A. Streamgraph des modules d'expression génique WGCNA le long de la « branche TE » du pseudo-temps. Chaque module est nommé par un de ses gènes le plus représentatif. Le niveau d'expression de chaque module est proportionnel à l'épaisseur du ruban sur le streamgraph et il correspond au poids du module WGCNA. Le pseudo-temps a été divisé en 9 sous-branches en fonction des modules d'expression de gènes où la « branche TE » est divisée en : 5.pré-TE (TE « précoce »), 8.TE.NR2F2- et 9.TE.NR2F2+. ① représente l'embranchement ICM/TE, ② représente l'embranchement EPI/PE. **B.** Niveau d'expression de facteurs de transcription spécifiques des modules de gènes. La heatmap est subdivisée suivant les sous-branches du pseudo-temps. Les gènes ont été sélectionnés en fonction de leur ordre hiérarchique dans les modules WGCNA. **C.** Représentation schématique du niveau d'expression spatio-temporelle pour chaque module de gènes. **D.** Représentation schématique et spatio-temporelle de l'enrichissement fonctionnel des modules de gènes exprimés dans la « branche TE ». Notes: cells: cellules, mod: module, TF: facteur de transcription.

4. Discussion

4.1. Etude de l'impact de la gradation morphologique du blastocyste

Le résultat principal de la première partie de ce travail est que la gradation du TE est le paramètre morphologique (suivant la classification de Gardner) le plus prédictif du taux de naissances vivantes des embryons transférés frais au stade de blastocyste. Cela va dans le sens de plusieurs études récentes (19,24,54) et souligne la nécessité de mieux caractériser le trophoctoderme de l'embryon humain pour identifier des marqueurs spécifiques de la qualité embryonnaire en fécondation *in vitro*.

Dans cette étude, le taux de naissances vivantes, est de 32,8%. Cela est au-dessus du taux national puisque en France, entre 2012 et 2015, pour les ICSI réalisées en intraconjugal, l'ABM rapporte des pourcentages d'accouchements par ponction (à l'exclusion des ponctions suivies de la congélation de la totalité de la cohorte embryonnaire) respectivement de 19,8%, 19,9%, 21,3% et 20,7% et respectivement de 18,3%, 19,6%, 21,3% et 20,3% pour les ICSI avec spermatozoïdes de donneurs (5). Dans la littérature récente de l'impact de la gradation morphologique du blastocyste, on retrouve des taux de naissances vivantes variant entre 21,9% et 52,7% (17,54) avec une moyenne du taux de naissances vivantes de 39,6% \pm 8,9% (à partir de l'analyse de dix études). Une attention particulière doit être apportée aux caractéristiques des populations étudiées. Par exemple dans le travail de l'équipe de Hill et *al.* (54), peu de détails sur la population sont communiqués notamment en ce qui concerne les antécédents de prise en charge et les causes d'infertilité. L'équipe de Abbeel et *al.* (20) avec un taux de naissances à 47,8% décrit, quant à elle, une population de femmes jeunes (inférieures à 33 ans), sans surpoids (indice de masse corporel < 24 kg/m²), sans cause d'infertilité féminine, et sans antécédent de stimulation.

En ce qui concerne la population « globale » d'étude de ce travail :

- moins de données démographiques relatives aux patients ont été analysées par rapport à celles des patientes. Cela est dû à un nombre important de données manquantes concernant notamment le poids et le statut tabagique des patients suivis.
- l'âge maternel n'est pas statistiquement différent en fonction de l'issue clinique (31,5 \pm 3,9 vs 31,7 \pm 4,4 ; $p=0,7386$). Cependant, il est connu que la probabilité des naissances vivantes diminue avec l'âge maternel (24,55,56) ; c'est pourquoi ce paramètre est pris en compte dans les analyses multivariées de ce travail.
- Le taux d'AMH est statistiquement différent : 5,0 \pm 4,5ng/mL pour le groupe « naissances vivantes » vs 3,9 \pm 2,7ng/mL pour le groupe « pas de naissance vivante » ; $p=0,0231$. Cependant pour le groupe « naissances vivantes » les valeurs d'AMH varient entre 0,35 – 36ng/mL alors que pour le groupe « pas de

naissance vivante » les valeurs d'AMH varient entre 0,3 – 14,48 ng/mL. Une seule patiente a une valeur d'AMH dosée à 36ng/mL et il ne nous a pas été possible de déterminer avec précision s'il s'agissait d'une erreur de saisie (absence de version papier du dosage dans le dossier). Quoiqu'il en soit, en excluant cette valeur aberrante, les valeurs du dosage de l'AMH pour l'issue clinique « naissances vivantes » varient entre 0,35 – 12,05ng/mL et les valeurs de l'AMH entre les deux groupes ne sont alors plus statistiquement différentes ($4,6 \pm 2,8$ ng/mL vs $3,9 \pm 2,7$ ng/mL ; $p=0,0778$). Cela est à mettre en regard du compte de follicules antraux (CFA) qui n'est pas statistiquement différent entre les deux groupes ($22 \pm 10,8$ vs $21 \pm 11,0$; $p=0,5999$), sachant qu'il existe une corrélation entre les dosages de l'AMH et le CFA (57-60).

- Les deux autres paramètres statistiquement différents en fonction de l'issue clinique « naissances vivantes » sont : le type d'infertilité avec une infertilité secondaire plus importante dans le groupe « naissances vivantes » (43 (53,1%) vs 58 (34,9%) ; $p=0,0065$), et le nombre de blastocystes ($3,6 \pm 2,5$ vs $3,0 \pm 1,8$; $p=0,0199$). Il est difficile de comparer ces observations avec celles des études récemment publiées car, bien qu'elles mentionnent les causes de l'infertilité, aucune ne précise le type d'infertilité. Seule l'étude de l'équipe de Abbeel et al. (20) a analysé le nombre de blastocystes à J5 entre les groupes « naissances vivantes » et « pas de naissance vivante » et retrouve une différence significative (2 [1-4] vs 3 [2-5] ; $p<0,0001$).

Au final, les deux groupes ne sont pas comparables en ce qui concerne le type d'infertilité (infertilité secondaire) et le nombre de blastocystes. Dans la population restreinte à la graduation de l'ICM et du TE, les deux groupes sont également différents en ce qui concerne le type d'infertilité (infertilité primaire et secondaire).

Dans cette étude, les analyses de comparaison de la répartition des embryons en fonction de leur morphologie et du taux de naissances vivantes montrent qu'un plus grand nombre d'embryons aboutit à une naissance vivante si ces embryons sont au stade B4 ou ont un TE gradué A (**Fig. 7**). Il en est de même lorsque l'issue clinique étudiée est l'implantation (**Annexe. 4**). Aucune différence significative n'est retrouvée, quelle que soit l'issue clinique étudiée, pour une ICM graduée A. Ces analyses montrent, également, que l'évaluation de la morphologie des embryons selon la classification de Gardner ne permet pas de discriminer parfaitement les embryons suivant l'issue clinique « naissances vivantes ». Pour les embryons avec une ICM graduée A, il n'y a pas de différence significative entre le nombre d'embryons ayant abouti à une naissance vivante et ceux n'ayant pas abouti à une naissance vivante (**Fig. 7B**). Si on s'intéresse au TE, les embryons avec un TE gradué A

aboutissent plus, de façon statistiquement significative, à une naissance vivante, mais cette observation est inversée pour les embryons avec un TE gradué B (**Fig. 7C**). Il est à noter que, tout de même, 20,3% des embryons transférés avec un TE grade B aboutissent à une naissance vivante. Ces considérations soulignent les limites du système de classification de Gardner sur lequel repose la stratégie de sélection de l'embryon à transférer. Cette stratégie permet la désélection d'embryons de mauvais grade plutôt que la sélection d'un embryon de bon grade.

En ce qui concerne les analyses de régression logistique, elles ont été réalisées et ajustées sur les variables retrouvées statistiquement associées dans l'analyse de régression logistique univariée (**Fig. 8**) et également ajustées sur les variables : « âge maternel », « dose totale de FSH » et « antécédents de stimulation ». Ces trois dernières variables sont reconnues dans la littérature comme pouvant être des facteurs de confusion (23,24,55,61). Les résultats de l'étude montrent une association statistiquement significative entre un TE de bas grade (B ou C) et le taux de naissances vivantes. Transférer un blastocyste avec un TE de grade B ou C diminuerait de près de 2/3 sa probabilité d'aboutir à une naissance vivante (**Fig. 8**). Ce résultat corrobore ceux de précédentes études qui s'intéressent à l'impact de la morphologie des blastocystes transférés frais sur le taux de naissances vivantes. Ainsi, l'association entre le grade du TE et le taux de naissances vivantes est retrouvée : par l'équipe de Ahlström et *al.* (24) (pour le TE A vs TE B : OR=0,56 ; IC95% [0,41 – 0,74] ; p=0,0001 et pour le TE A vs TE C : OR=0,17 ; IC95% [0,04 – 0,76] ; p=0,0198), par l'équipe de Hill et *al.* (54) (pour le grade du TE : OR=1,93; IC95% [1,34 – 2,71] ; p<0,05), par l'équipe de Thompson et *al.* (19) (pour le grade du TE : OR=1,23; IC95% [1,04 – 1,46] ; p=0,0131), par l'équipe de Chen et *al.* (23) (pour le TE A et B vs TE C : OR=0,59 ; IC95% [0,35 – 0,99] ; p=0,045). En contrepartie, ce travail ne met pas en avant d'association entre l'expansion des blastocystes et le taux de naissances vivantes, ni entre le grade de l'ICM et le taux de naissances vivantes alors que ces paramètres ont pu être retrouvés, précédemment, comme prédictifs des taux de naissances (16-20,24). Cette observation pourrait faire reconsidérer la stratégie de sélection des embryons en privilégiant le grade du TE avant celui de l'ICM. L'absence d'un lien de corrélation significatif entre l'expansion et le taux de naissances vivantes peut être en partie expliquée par la restriction de l'analyse aux blastocystes pour lesquels la graduation de l'ICM et du TE étaient possibles : c'est-à-dire aux stades B3, B4 et B5.

Certaines limites, dans cette étude, doivent nous faire interpréter les résultats avec précaution. Tout d'abord, il s'agit d'une étude monocentrique et rétrospective (cela est le cas de nombreuses études publiées sur le sujet). Ensuite, le « faible » nombre de cycles inclus dans l'étude pourrait affecter la précision avec laquelle une différence statistique y est mise en évidence. Les transferts mono-embryonnaires à J5 après vitrification ont été exclus de

l'analyse. Cela peut avoir un impact notamment sur la population d'étude, car la préparation de l'endomètre en vue d'un transfert d'embryon congelé serait plus « physiologique » que lors du transfert d'un embryon frais après stimulation ovarienne (62). Cependant, dans le service de Biologie de la Reproduction du CHU de Nantes et en France, la stratégie de transfert frais embryonnaire est réalisée pour tout premier transfert sur une tentative, en l'absence de contre-indications (risque d'hyperstimulation, endomètre « impropre » à la nidation, échecs répétés de transferts frais...). En conséquence il est pertinent d'avoir mené ce travail sur les transferts frais.

4.2. Détermination de marqueurs de la lignée trophoblastique dans l'embryon humain pré-implantatoire

Le résultat central de la première partie de ce travail est l'association statistiquement significative entre la morphologie du TE et le taux de naissances vivantes. Elle laisse à penser qu'un TE de meilleur grade correspondrait à un TE plus « fonctionnel ». Celui-ci aurait alors acquis les caractéristiques nécessaires à l'implantation de l'embryon dans l'endomètre maternel, et celles nécessaires au développement des structures placentaires. C'est précisément sur la caractérisation de ces événements que la deuxième partie de ce travail a porté.

Le premier événement de spécification de lignée entre l'ICM et le TE chez l'Homme, apparaît au stade blastocyste B3, au jour E5. Cette observation contraste avec les connaissances que nous avons du modèle murin puisque chez la souris cette différenciation apparaît au stade 16 cellules (30,31). La preuve expérimentale de cet engagement « tardif » au stade B3/E5 repose sur la mise en évidence par l'équipe de De Paepe et *al.* (52) de la plasticité des cellules « externes » de l'embryon. En effet, à ce stade, ces cellules peuvent encore donner des cellules de l'ICM, alors que cette plasticité est perdue au stade de blastocyste expansé B4/E6. L'analyse des événements moléculaires orchestrant la première spécification de lignée chez la souris n'est pas retrouvée à l'identique chez l'Homme. Ces observations confirment des différences majeures inter-espèces dans l'établissement de la différenciation du TE et de l'ICM (30). Et à l'heure actuelle le réseau moléculaire sous-tendant, chez l'Homme, cette spécification de lignée, n'est pas élucidée.

En ce qui concerne le TE de l'embryon humain pré-implantatoire, les résultats de ce travail confirment qu'il existe des facteurs de transcription spécifiques de la lignée TE. Certains, comme GATA3, sont spécifiques du type cellulaire, qu'il s'agisse du TE « précoce » ou du TE « tardif » (**Annexe. 7**) (63) ; d'autres ont une expression plus retardée ou plus transitoire. C'est le cas de CDX2 (30,63), de GATA2 (48) ou de NR2F2 qui sont des marqueurs de la maturation du TE de l'embryon humain pré-implantatoire. Les facteurs de transcription de la

famille GATA sont caractérisés par des motifs en doigt de zinc. Le rôle de GATA3 dans la différenciation du TE a été mise en évidence chez la souris (64,65). *In vitro*, dans les cellules souches embryonnaires murines, GATA3 est capable d'induire l'expression de gènes du trophoblaste indépendants de l'expression de CDX2, et de promouvoir, dans les cellules souches trophoblastiques murines, la différenciation vers des cellules du TE post-implantatoire (66). L'équipe de Ray et *al.* (65) a également montré qu'il existait, au cours de la différenciation trophoblastique, un « switch » de GATA3 vers GATA2. La protéine GATA2 formant, au locus de *GATA2*, un complexe nucléoprotéique plus stable que celui formé par GATA3.

Depuis de nombreuses années, l'observation est faite que les embryons humains débutent leur implantation par l'apposition du TE polaire sur l'endomètre de l'utérus maternel (63,67-69). Cela suggère que, pour qu'un embryon s'implante, le TE polaire doit acquérir une compétence fonctionnelle. Actuellement, en microscopie de routine (microscope contraste de phase avec un grossissement maximal x400) il n'est morphologiquement pas possible de différencier le TE polaire du TE mural pour choisir l'embryon à transférer qui aurait le plus grand potentiel d'implantation. Des études récentes de l'analyse du transcriptome de l'embryon humain pré-implantatoire se sont intéressées à rechercher s'il existait une différence d'expression de gènes, au sein du TE, qui ségrégerait le TE en deux populations cellulaires : l'une correspondant au TE polaire, l'autre correspondant au TE mural. L'équipe de Petropoulos et *al.* (34) a montré qu'au sein de son panel de gènes spécifiques du TE, 129 gènes étaient surexprimés uniquement dans une sous-population du TE. L'enrichissement fonctionnel, *in silico*, a révélé que ce cluster de gènes est associé à la communication inter-cellulaire. Ils ont émis l'hypothèse que cette signature moléculaire correspondait au TE polaire en confirmant leurs résultats par une immunofluorescence CCR7. La protéine CCR7 est un récepteur de chimiokines connu pour être surexprimé en condition hypoxique et après la différenciation post-implantatoire du TE en cytotrophoblaste (CT). L'équipe de Niakan et *al.* (32) a étudié l'expression protéique de FGFR1 et montré par immunofluorescence que ce récepteur au facteur de croissance fibroblastique était secondairement restreint aux cellules du TE polaire dans les blastocystes de plus de 164 cellules (ce marqueur est connu pour être exprimé dans les cellules progénitrices du trophoblaste humain du premier trimestre de grossesse). Cela conforte l'hypothèse selon laquelle la maturation du TE polaire pourrait être initiée par un dialogue moléculaire entre les cellules de l'ICM et les cellules du TE qui lui sont directement adjacentes (37), à l'instar de ce qui est observé, *in vitro*, dans l'espèce murine (70,71).

Le présent travail, a permis de mettre, pour la première fois, en avant, l'expression d'un facteur de transcription : NR2F2, restreint aux cellules du TE polaire dans le blastocyste tardif pré-implantatoire. Cette découverte est majeure au vu de la nature de cette protéine

(facteur de transcription), elle pourrait jouer un rôle central dans la maturation du TE nécessaire à l'implantation des embryons humains.

L'analyse, *in silico*, des données transcriptomiques des embryons humains pré-implantatoires souligne que les clusters de gènes exprimés dans la « branche TE » sont significativement liés avec les événements de jonctions cellulaires (pour le module GATA2) et liés avec les événements de la stéroïdogénèse ovarienne (pour le module NR2F2). Cela corrobore le fait que les cellules du TE ont un morphotype épithélial caractérisé par la présence de complexes jonctionnels tels que ZO-1 et l'E-cadhérine, et le fait que les cellules du TE polaires sont impliquées dans les interactions materno-fœtales.

De la recherche à l'application clinique

L'avantage de ces travaux expérimentaux est qu'ils permettent de mieux comprendre le développement de l'embryon humain pré-implantatoire dans le but d'identifier des marqueurs spécifiques de la qualité des embryons en fécondation *in vitro*. Cela est d'autant plus important que la sélection de l'embryon à transférer, qui repose actuellement sur une évaluation morphologique, est imparfaite. Cette limite peut être imputable à des variations inter et intra-observateur (26,28), mais aussi au système de graduation lui-même. En effet, les événements de morphogénèse sont issus de l'expression de gènes qui doit être antérieure à l'acquisition de la fonctionnalité de la protéine issue de ce gène. Autrement dit : se baser sur l'aspect morphologique d'un embryon à J5-J6 pour évaluer sa capacité à s'implanter, à J7-J8, est peut-être moins judicieux que de mettre en évidence l'expression ou la non expression d'un marqueur, à J5-J6, nécessaire à l'implantation de l'embryon à J7-J8. Du fait de la réglementation française relative à la recherche sur l'embryon humain et du fait de la nature des techniques réalisées dans la partie expérimentale de ce travail, il est difficile de faire cliniquement le lien entre l'expression de NR2F2 et les taux d'implantation ou les taux de grossesses vivantes (ces embryons ne pouvant être transférés). Cependant, nos résultats peuvent être confirmés en ce qui concerne le rôle fonctionnel de NR2F2. Des expériences d'inactivation du gène NR2F2 par KO, dans l'embryon humain, pourraient être envisagées (à l'instar de ce qui a été réalisé pour le gène POU5F1 (OCT4) par l'équipe de Forgy et *al.* (46)) en système de culture *in vitro* permettant l'étude de l'implantation de l'embryon humain (63,68,69). La mise en évidence de nouveaux marqueurs spécifiques de la qualité embryonnaire en fécondation *in vitro*, passera aussi par l'identification des cibles de NR2F2. Enfin, comprendre comment a lieu la différenciation du TE chez l'Homme devrait aussi permettre de déterminer quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la spécification et dans la maturation du TE, et notamment quels sont les acteurs du dialogue moléculaire entre le TE et l'ICM. Leur identification pourrait permettre d'améliorer la composition des milieux de culture des embryons.

5. Conclusion

L'incidence croissante de l'infertilité fait que de plus en plus de couples sont amenés à consulter pour une prise en charge en AMP. Un enjeu majeur pour les laboratoires d'AMP en cas de recours à une technique de fécondation *in vitro*, qu'il s'agisse de FIV-classique ou de FIV-ICSI, réside dans la sélection du meilleur embryon à transférer. Cet embryon est celui qui idéalement présente le plus grand potentiel d'implantation et, in fine, celui qui a la plus grande probabilité d'aboutir à une naissance vivante. Le choix de cet embryon repose, actuellement, sur une évaluation morphologique. Dans le cadre du transfert à J5, au stade de blastocyste, cette évaluation comprend l'analyse de trois paramètres : l'expansion du blastocyste, la qualité de l'ICM et la qualité du TE. Déterminer le lien de corrélation entre chacun de ces paramètres et les taux de naissances vivantes est une problématique centrale depuis ces dernières décennies, afin de définir la stratégie de sélection des embryons à transférer. Bien que les résultats des études divergent, plusieurs d'entre elles, dont ce travail mené dans le centre de biologie de la Reproduction de Nantes, montrent que le grade du TE serait associé plus fortement que le grade de l'ICM, à de meilleurs taux de naissances vivantes. Cependant, la stratégie de sélection des embryons reposant uniquement sur une évaluation morphologique a ses limites. En effet, il existe une variabilité inter et intra-observateur à la lecture des embryons sous microscope, et même en considérant le transfert d'embryons avec un TE de bonne qualité, le pouvoir prédictif de l'implantation et de l'issue favorable de la grossesse est modeste.

C'est pourquoi, il est nécessaire de mieux comprendre le développement de l'embryon humain pré-implantatoire, notamment en ce qui concerne la différenciation du TE, pour définir de nouveaux marqueurs spécifiques de la qualité embryonnaire. Dans cette étude, l'analyse de données transcriptomiques et protéiques de l'embryon humain pré-implantatoire, a permis de mettre en évidence une expression trophoblastique, et initialement restreinte au TE polaire de NR2F2. Ce qui laisse suggérer que ce facteur de transcription serait un acteur central de la différenciation du TE et de l'acquisition de la compétence fonctionnelle du TE à l'implantation. Ce résultat expérimental demande à être confirmé (modèles embryonnaires KO pour NR2F2), et les cibles de NR2F2 demandent à être étudiées dans l'espoir d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques de la qualité embryonnaire en fécondation *in vitro*.

6. Références bibliographiques

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human Reproduction*. 1 nov 2009;24(11):2683- 7.
2. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, et al. ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod*. 1 sept 2018;33(9):1586- 601.
3. Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique [Internet]. [cité 3 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2015/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>
4. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. ESTABLISHING FULL-TERM HUMAN PREGNANCIES USING CLEAVING EMBRYOS GROWN IN VITRO*. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. sept 1980;87(9):737- 56.
5. Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique [Internet]. [cité 3 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>
6. Stephen EH, Chandra A. Updated projections of infertility in the United States: 1995–2025. *Fertility and Sterility*. 1 juill 1998;70(1):30- 4.
7. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. juin 2011;26(6):1270- 83.
8. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. déc 1998;13(12):3434- 40.
9. Croxatto HB, Fuentealba B, Diaz S, Pastene L, Tatum HJ. A simple nonsurgical technique to obtain unimplanted eggs from human uteri. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1 mars 1972;112(5):662- 8.
10. Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod*. juin 2001;16(6):1115- 9.
11. Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 30 juin 2016;(6):CD002118.
12. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. juin 1999;11(3):307- 11.
13. Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertility and Sterility*. 1 juin 2001;75(6):1126- 30.

14. Yoon H-G, Yoon S-H, Son W-Y, Im K-S, Lim J-H. High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. *Fertility and Sterility*. 1 avr 2001;75(4):832- 3.
15. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and Sterility*. 1 déc 2001;76(6):1157- 67.
16. Zaninovic N, Berrios R, Clarke R., Bodine R, Ye Z, Veeck L. Blastocyst expansion, inner cell mass (ICM) formation, and trophectoderm (TM) quality: is one more important for implantation? *Fertility and Sterility*. sept 2001;76:S8.
17. Du Q-Y, Wang E-Y, Huang Y, Guo X-Y, Xiong Y-J, Yu Y-P, et al. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. *Fertility and Sterility*. 1 avr 2016;105(4):910-919.e1.
18. Subira J, Craig J, Turner K, Bevan A, Ohuma E, McVeigh E, et al. Grade of the inner cell mass, but not trophectoderm, predicts live birth in fresh blastocyst single transfers. *Human Fertility*. 1 oct 2016;19(4):254- 61.
19. Thompson SM, Onwubalili N, Brown K, Jindal SK, McGovern PG. Blastocyst expansion score and trophectoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): a national study. *J Assist Reprod Genet*. 1 déc 2013;30(12):1577- 81.
20. Abbeel EV den, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJG, Klein BM, et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reproductive BioMedicine Online*. 1 oct 2013;27(4):353- 61.
21. Ahlström A, Westin C, Wikland M, Hardarson T. Prediction of live birth in frozen–thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw morphology. *Hum Reprod*. 1 mai 2013;28(5):1199- 209.
22. Ebner T, Tritscher K, Mayer RB, Oppelt P, Duba H-C, Maurer M, et al. Quantitative and qualitative trophectoderm grading allows for prediction of live birth and gender. *J Assist Reprod Genet*. 1 janv 2016;33(1):49- 57.
23. Chen X, Zhang J, Wu X, Cao S, Zhou L, Wang Y, et al. Trophectoderm morphology predicts outcomes of pregnancy in vitrified-warmed single-blastocyst transfer cycle in a Chinese population. *J Assist Reprod Genet*. 1 nov 2014;31(11):1475- 81.
24. Ahlström A, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod*. 1 déc 2011;26(12):3289- 96.
25. Zhao Y-Y, Yu Y, Zhang X-W. Overall Blastocyst Quality, Trophectoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer Cycles. *Chinese Medical Journal*. 2018;131(11):1261.
26. Paternot G, Wetzels AM, Thonon F, Vansteenbrugge A, Willemen D, Devroe J, et al. Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: a multicentre study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. déc 2011;9(1):127.

27. Assín RR de, Clavero A, Gonzalvo MC, Ramírez JP, Zamora S, Fernández A, et al. Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reproductive BioMedicine Online*. 1 déc 2009;19(6):824- 9.
28. Arce J-C, Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmgård L, Sørensen P. Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Hum Reprod*. 1 août 2006;21(8):2141- 8.
29. Blakeley P, Fogarty NME, Valle I del, Wamaitha SE, Hu TX, Elder K, et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development*. 15 sept 2015;142(18):3151- 65.
30. Rossant J, Tam PPL. New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 5 janv 2017;20(1):18- 28.
31. Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development*. 1 avr 2016;143(7):1063- 74.
32. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 1 mars 2012;139(5):829- 41.
33. Niakan KK, Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental Biology*. 1 mars 2013;375(1):54- 64.
34. Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, Deng Q, Panula SP, Codeluppi S, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell*. 5 mai 2016;165(4):1012- 26.
35. Zhu P, Guo H, Ren Y, Hou Y, Dong J, Li R, et al. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nature Genetics*. janv 2018;50(1):12- 9.
36. Salamonsen LA, Evans J, Nguyen HPT, Edgell TA. The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1 mars 2016;75(3):218- 25.
37. James J. Overview of Human Implantation. In: *Pathobiology of Human Disease* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 7 sept 2018]. p. 2293- 307. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012386456705005X>
38. Licht P, Russu V, Wildt L. On the Role of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) in the Embryo-Endometrial Microenvironment: Implications for Differentiation and Implantation. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2001;19(01):037- 48.
39. Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart J-M, Geenen V, d'Hauterive SP. Human chorionic gonadotropin: A hormone with immunological and angiogenic properties. *Journal of Reproductive Immunology*. 1 mai 2010;85(1):93- 8.
40. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Fertilization and early embryology: Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Human Reproduction*. déc

1993;8(12):2119- 27.

41. Lopata A. Implantation of the human embryo. *Hum Reprod.* sept 1996;11 Suppl 1:175- 84; discussion 193-195.
42. Kirkegaard K, Villesen P, Jensen JM, Hindkjær JJ, Kølvrå S, Ingerslev HJ, et al. Distinct differences in global gene expression profiles in non-implanted blastocysts and blastocysts resulting in live birth. *Gene.* 25 oct 2015;571(2):212- 20.
43. Jones GM, Cram DS, Song B, Kokkali G, Pantos K, Trounson AO. Novel strategy with potential to identify developmentally competent IVF blastocysts. *Hum Reprod.* 1 août 2008;23(8):1748- 59.
44. James JL, Carter AM, Chamley LW. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta.* 1 mai 2012;33(5):327- 34.
45. Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology.* sept 2013;20(9):1131- 9.
46. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature.* oct 2017;550(7674):67- 73.
47. Qiu X, Mao Q, Tang Y, Wang L, Chawla R, Pliner HA, et al. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nature Methods.* oct 2017;14(10):979- 82.
48. Kilens S, Meistermann D, Moreno D, Chariou C, Gaignerie A, Reignier A, et al. Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nature Communications.* 24 janv 2018;9(1):360.
49. Freour T, Vassena R. Transcriptomics analysis and human preimplantation development. *Journal of Proteomics.* 6 juin 2017;162:135- 40.
50. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod.* 1 sept 2017;32(9):1786- 801.
51. Ciray, H. N. *et al.* Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum. Reprod.* **29**, 2650–2660 (2014).
52. De Paepe C, Cauffman G, Verloes A, Sterckx J, Devroey P, Tournaye H, et al. Human trophoctoderm cells are not yet committed. *Hum Reprod.* 1 mars 2013;28(3):740- 9.
53. Rosa A, Brivanlou AH. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. *EMBO J.* 19 janv 2011;30(2):237- 48.
54. Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, et al. Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertility and*

Sterility. 1 avr 2013;99(5):1283-1289.e1.

55. Rhenman A, Berglund L, Brodin T, Olovsson M, Milton K, Hadziosmanovic N, et al. Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos. *Hum Reprod.* 1 janv 2015;30(1):28- 36.
56. Goto S, Kadowaki T, Tanaka S, Hashimoto H, Kokeguchi S, Shiotani M. Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1,488 single frozen-thawed blastocyst transfer cycles. *Fertility and Sterility.* 1 mars 2011;95(3):948- 52.
57. Baker VL, Gracia C, Glassner MJ, Schnell VL, Doody K, Coddington CC, et al. Multicenter evaluation of the Access AMH antimüllerian hormone assay for the prediction of antral follicle count and poor ovarian response to controlled ovarian stimulation. *Fertility and Sterility.* 1 août 2018;110(3):506-513.e3.
58. Anderson RA, Anckaert E, Bosch E, Dewailly D, Dunlop CE, Fehr D, et al. Prospective study into the value of the automated Elecsys antimüllerian hormone assay for the assessment of the ovarian growing follicle pool. *Fertility and Sterility.* 1 avr 2015;103(4):1074-1080.e4.
59. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertility and Sterility.* 1 janv 2011;95(1):170- 5.
60. Broer SL, Dólleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJM. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 1 janv 2011;17(1):46- 54.
61. Honnma H, Baba T, Sasaki M, Hashiba Y, Ohno H, Fukunaga T, et al. Trophectoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization. *Fertility and Sterility.* 1 août 2012;98(2):361- 7.
62. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility.* 1 janv 2013;99(1):156- 62.
63. Deglincerti A, Croft GF, Pietila LN, Zernicka-Goetz M, Siggia ED, Brivanlou AH. Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. *Nature.* mai 2016;533(7602):251- 4.
64. Home P, Ray S, Dutta D, Bronshteyn I, Larson M, Paul S. GATA3 Is Selectively Expressed in the Trophectoderm of Peri-implantation Embryo and Directly Regulates Cdx2 Gene Expression. *J Biol Chem.* 16 oct 2009;284(42):28729- 37.
65. Ray S, Dutta D, Rumi MAK, Kent LN, Soares MJ, Paul S. Context-dependent Function of Regulatory Elements and a Switch in Chromatin Occupancy between GATA3 and GATA2 Regulate Gata2 Transcription during Trophoblast Differentiation. *J Biol Chem.* 20 févr 2009;284(8):4978- 88.
66. Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, Sasaki H, Chea E, Rugg-Gunn P, et al. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development.* 1 févr 2010;137(3):395- 403.

67. Lindenberg S. Ultrastructure in human implantation: transmission and scanning electron microscopy. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* mars 1991;5(1):1- 14.
68. Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, Recher G, Hupalowska A, Bolton V, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nature Cell Biology.* juin 2016;18(6):700- 8.
69. Aberkane A, Essahib W, Spits C, De Paepe C, Sermon K, Adriaenssens T, et al. Expression of adhesion and extracellular matrix genes in human blastocysts upon attachment in a 2D co-culture system. *Mol Hum Reprod.* 1 juill 2018;24(7):375- 87.
70. Rivron NC, Frias-Aldeguer J, Vrij EJ, Boisset J-C, Korving J, Vivié J, et al. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature.* mai 2018;557(7703):106- 11.
71. White MD, Zenker J, Bissiere S, Plachta N. Instructions for Assembling the Early Mammalian Embryo. *Dev Cell.* 18 2018;45(6):667- 79.

7. Annexes

Liste des figures

Figure 1. Fécondation <i>in vitro</i>	7
Figure 2. Taux moyen de naissances vivantes en fonction du score embryonnaire rIMC et de l'âge maternel.....	8
Figure 3. Développement embryonnaire.....	12
Figure 4. Cinétique du développement embryonnaire.....	14
Figure 5. Pseudo-temps : modèle du développement humain pré-implantatoire.....	17
Figure 6. Diagramme de répartition des cycles FIV-ICSI inclus dans l'étude	18
Figure 7. Analyse descriptive de la morphologie embryonnaire et des naissances vivantes .	28
Figure 8. Etude de la corrélation en fonction de l'issue clinique "naissances vivantes"	30
Figure 9. Analyse de régression logistique "stepwise" en fonction des naissances vivantes.	31
Figure 10. Projection des embryons sur le pseudo-temps	32
Figure 11. Projection des embryons KO OCT4 sur le pseudo-temps et interfaces Pseudo-time User.....	33
Figure 12. Expression génique des GATA3, GATA2, DLX5, NR2F2	34
Figure 13. Identification d'un marqueur du TE mature : NR2F2	36
Figure 14. Séquence spatio-temporelle des évènements de la maturation du TE pré-implantatoire humain	37

Liste des tables

Table 1. Nombre de centre d'AMP, de cycles de traitement et de nouveau-nés en Europe de 1997 à 2014	5
Table 2. Caractéristiques démographiques des cycles des transferts en fonction de l'issue.	24
Table 3. Caractéristiques de la stimulation ovarienne des transferts en fonction de l'issue...	25
Table 4. Caractéristiques des tentatives des transferts en fonction de l'issue.....	26

Liste des abréviations :

ABM : Agence de la BioMédecine
AMH : Hormone Anti-Müllerienne
AMP : Assistance Médicale à la Procréation
ARN : Acide RiboNucléique
B : Blastocyste
BIM : Indice de Masse Corporelle
BT : Biopsie testiculaire
Cells : Cellules
CFA : Compte des Follicules Antraux
CP : Culture prolongée
CT : Cytotrophoblaste
CTEV : Cytotrophoblaste Extra-Villeux
DPI : Dépistage Pré-Implantatoire
E : Embryo day = jour de développement embryonnaire
E2 : Œstrogène
EPI : Epiblaste
FIV : Fécondation *In Vitro*
FIV-ICSI : Fécondation *In Vitro* avec injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde
FSH : Hormone FolliculoStimulante
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone = hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
hCG : Hormone Chorionique Gonadotrope humaine
IC95% : Intervalle de Confiance 95%
ICM : Masse Cellulaire Interne
IF : ImmunoFluorescence
ISSCR : The International Society for Stem Cell Research
J : jour de développement embryonnaire
KO : Knocked Out = technique d'inactivation d'un gène

LH : Hormone Lutéinisante
MC : Morula
MII : Ovocyte mature en Métaphase II
n : Nombre de l'effectif
N° : Numéro
NA : Non Applicable
Nbe : Nombre
ns : Non Significatif
Nuclei : Noyaux
OATS : Oligo-Asthéno-TératoSpermie
OR : Odds Ratio
p : p-valeur
PE : Endoderme primitif
PFA : ParafFormAldéhyde
Pg : Progestérone
PN : Pronucleus
PVP : PolyVinylPyrrolidone
RNA-Seq : Séquençage ARN en cellules uniques
sc-RNASeq : Séquençage ARN en cellules uniques
SET : Single Embryo Transfer = transfert mono-embryonnaire
SG : Semaine de Gestation
spz : Spermatozoïdes
ST : Syncytiotrophoblaste
TE : Trophectoderme
TF : Facteur de Transcription
tM : Morula compactée
tSB : Début de cavitation
WGCNA : Weighted Genes Co-expression Network Analysis = analyse par étude de la corrélation d'expression de gènes
WHO : World Health Organization = organisation mondiale de la santé
ZP : Zone Pellucide
TLM : Time-Lapse Morphokinetic

Annexe 1. Consensus de classification des blastocystes suivant la classification de Gardner et Schoolcraft 1999 (ALPHA Scientists in Reproductive Medicine, 2011)

Table VIII Consensus scoring system for blastocysts.

	Grade	Rating	Description
Stage of development	1		Early
	2		Blastocyst
	3		Expanded
	4		Hatched/hatching
ICM	1	Good	Prominent, easily discernible, with many cells that are compacted and tightly adhered together
	2	Fair	Easily discernible, with many cells that are loosely grouped together
	3	Poor	Difficult to discern, with few cells
TE	1	Good	Many cells forming a cohesive epithelium
	2	Fair	Few cells forming a loose epithelium
	3	Poor	Very few cells

The scoring system for blastocysts is a combination of the stage of development, and of the grade of the ICM and of the TE (e.g. an expanded blastocyst with a good ICM and a fair TE would be scored as 312). It is a numerical interpretation of the Gardner scale (Gardner and Schoolcraft, 1999a,b).

Annexe 2. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunofluorescence des embryons humains pré-implantatoires

Anticorps primaires	Espèce	Type	Companie	Cat n°	Dilution
NANOG	Chèvre	Poly	R&D	AF1997	1/200
Ecadherine	Souris	Mono	abcam	ab1416	1/500
IFI16	Lapin	Poly	novusbio	nbp1-97716	1/100
AQP3	Lapin	Poly	ac on lines	ab109737	1/400
NR2F2	Lapin	Poly	abcam	ab211776	1/100
GATA2	Souris	Mono	Sigma	WH0002624M1	1/50
GATA3	Souris	Mono	BD	560136	1/100
SOX17	Chèvre	Poly	R&D	AF1924	1/200
GATA3	Chèvre	Poly	R&D	AF2605	1/200

Anticorps secondaires	Espèce	Réactivité	Companie	Cat n°	Dilution
Alexa-Fluor 488	Singe	Lapin	Life Technologies	A10037	1/1000
Alexa-Fluor 488	Singe	Souris			1/1000
Alexa-Fluor 568	Singe	Lapin			1/1000
Alexa-Fluor 568	Singe	Souris	Life Technologies	A21447	1/1000
Alexa-Fluor 568	Singe	Chèvre			1/1000
Alexa-Fluor 647	Singe	Chèvre	Life Technologies	A21447	1/1000

Annexe 3. Caractéristiques des cycles avec gradation morphologique de l'ICM et du TE en fonction de l'implantation

A. Caractéristiques démographiques des cycles des transferts en fonction de l'issue

	Implantation	Pas d'implantation	p-valeur	Significativité
Nombre total de cycles	74	127		
Caractéristiques des patientes				
Age maternel (ans)	31,5 ± 3,9	31,4 ± 4,3	0,9058	ns
BMI maternel (kg/m ²)	23,0 ± 4,4	24,2 ± 4,9	0,0957	ns
Tabagisme actif	15 (20,3%)	26 (20,5%)	0,9726	ns
Tabagisme sevré	21 (28,4%)	22 (17,3%)	0,0653	ns
Réserve ovarienne				
AMH (ng/mL)	5,0 ± 4,6	4,13 ± 2,8	0,0947	ns
CFA	22 ± 10,8	21 ± 11,0	0,5888	ns
Caractéristiques des patients				
Age paternel (ans)	33,5 ± 4,6	34,9 ± 5,9	0,0807	ns
Caractéristiques de l'infertilité du couple				
Durée infertilité (ans)	2,4 ± 2,4	3,0 ± 2,1	0,0645	ns
Infertilité primaire	30 (40,5%)	70 (55,1%)	0,0462	*
Infertilité secondaire	42 (56,8%)	46 (36,2%)	0,0046	**
Infertilité primo-secondaire	2 (2,7%)	11 (8,7%)	0,1381	ns
Causes féminines de l'infertilité				
Absence de facteurs féminins	20 (27,0%)	32 (25,2%)	0,7751	ns
Ovulation normale	22 (29,7%)	37 (29,1%)	0,9287	ns
WHO I	0 (0,0%)	2 (1,6%)	0,5324	ns
WHO IIa	32 (43,2%)	65 (51,2%)	0,2774	ns
WHO IIb	14 (18,9%)	18 (14,2%)	0,3751	ns
WHO III	6 (8,1%)	5 (3,9%)	0,2179	ns
Endométriose	1 (1,4%)	4 (3,1%)	0,6537	ns
Tubaire	4 (5,4%)	7 (5,5%)	1,0000	ns
Autres causes féminines	0 (0,0%)	4 (3,1%)	0,2988	ns
Causes masculines de l'infertilité				
Absence de facteurs masculins	19 (25,7%)	24 (18,9%)	0,2584	ns
Azoospermie excrétrice	2 (2,7%)	8 (6,3%)	0,3297	ns
Azoospermie sécrétoire	2 (2,7%)	2 (1,6%)	0,6262	ns
OATS	50 (67,6%)	87 (68,5%)	0,8907	ns
Post-chimiothérapie	0 (0,0%)	2 (1,6%)	0,5324	ns
Problème sexologique	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1,0000	ns
Autres causes masculines	4 (5,4%)	8 (6,3%)	1,0000	ns

Notes:

- Les valeurs continues sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- BMI: indice de masse corporel – AMH: hormone anti-müllérienne – CFA: compte des follicules antraux

- WHO: classification des dysovulations suivant l'organisation mondiale de la santé – OATS: oligo-astheno-tératospermie sévère.

Annexe 3. Caractéristiques des cycles avec gradation morphologique de l'ICM et du TE en fonction de l'implantation

B. Caractéristiques de la stimulation ovarienne des transferts en fonction de l'issue

	Implantation	Pas d'implantation	p-valeur	Significativité
Nombre total de cycles	74	127		
Antériorités d'AMP				
Stimulations simples	10 (13,5%)	12 (9,4%)	0,3733	ns
Inséminations intra-utérines	10 (13,5%)	9 (7,1%)	0,1331	ns
Numéro de la demande				
1ère demande	58 (78,4%)	108 (85,0%)	0,2297	ns
2ème demande	15 (20,3%)	19 (15,0%)	0,3328	ns
3ème demande	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,1344	ns
Antériorités de stimulation				
Aucune	31 (41,9%)	48 (37,8%)	0,5663	Ns
1 stimulation	24 (32,4%)	47 (37,0%)	0,5128	ns
2 stimulations	10 (13,5%)	23 (18,1%)	0,3962	ns
3 stimulations	6 (8,1%)	6 (4,7%)	0,3641	ns
4 stimulations	3 (4,1%)	2 (1,6%)	0,3596	ns
5 stimulations	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1,0000	ns
Numéro de ponction				
1ère ponction	39 (52,7%)	54 (42,5%)	0,1626	ns
2ème ponction	23 (31,1%)	53 (41,7%)	0,1331	ns
3ème ponction	6 (8,1%)	15 (11,8%)	0,4078	ns
4ème ponction	4 (5,4%)	3 (2,4%)	0,4267	ns
5ème ponction	2 (2,7%)	1 (0,8%)	0,5559	ns
6ème ponction	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1,0000	ns
Stimulation ovarienne				
Durée de la stimulation (j)	9,4 ± 1,5	9,4 ± 1,5	0,9853	ns
Dose initiale en gonadotrophines (UI/j)	225 ± 95,2	250 ± 103,5	0,1945	ns
Dose totale en gonadotrophines (UI)	2202 ± 995,5	2364 ± 1027,4	0,2771	ns
Au jour du déclenchement				
Taux de Pg (ng/mL)	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,4504	ns
Dosage d'E2(pg/mL)	1945 ± 847	1983 ± 821	0,7545	ns
Dosage de LH (UI/mL)	1,9 ± 1,3	1,9 ± 1,8	0,9050	ns
Epaisseur de l'endomètre (cm)	9,2 ± 1,4	8,9 ± 1,8	0,2336	ns

Notes:

- Les valeurs continues sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- AMP: assistance médicale à la procréation – Pg: progestérone – E2: Œstrogène – LH: hormone lutéinisante.

Annexe 3. Caractéristiques des cycles avec gradation morphologique de l'ICM et du TE en fonction de l'implantation

C. Caractéristiques des tentatives des transferts en fonction de l'issue

	Implantation	Pas d'implantation	p-valeur	Significativité
Nombre total de cycles	74	127		
Origine des spermatozoïdes				
ICSI avec sperme frais	67 (90,5%)	109 (85,8%)	0,3287	ns
ICSI avec sperme congelé	5 (6,8%)	6 (4,7%)	0,5412	Ns
ICSI avec BT	2 (2,7%)	12 (9,4%)	0,0874	ns
Caractéristiques du sperme				
[spermatozoïdes](M/mL)	2,15 ± 2,88	2,42 ± 3,60	0,5753	ns
[spermatozoïdes mobiles progressifs](M/mL)	1,05 ± 1,39	1,02 ± 1,80	0,9248	ns
Caractéristiques de l'ICSI				
Nbe d'ovocytes ponctionnés	11,9 ± 4,5	11,5 ± 4,8	0,5613	ns
Nbe d'ovocytes matures	9,0 ± 4,0	8,3 ± 3,4	0,1538	ns
Nbe d'ovocytes injectés	9,0 ± 3,8	8,1 ± 3,2	0,3049	ns
Nbe de 2PN à 25h	1,4 ± 1,6	1,4 ± 2,0	0,9207	ns
Nbe de OPN à 25h	2,9 ± 2,8	2,9 ± 2,4	0,6384	ns
Nbe de 2PN à J1	5,5 ± 2,7	4,8 ± 2,5	0,0409	*
Nbe de zygotes ≥ à 3PN à J1	0,2 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,6555	ns
Nbe total d'embryons J3	5,6 ± 2,7	5,0 ± 2,3	0,0582	ns
Nbe d'embryons en CP	5,0 ± 2,6	4,4 ± 2,1	0,0976	ns
Nbe de blastocystes	3,8 ± 2,5	3,2 ± 1,8	0,0681	ns

Notes:

- Les valeurs continues sont exprimées en moyenne ± écart-type. Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

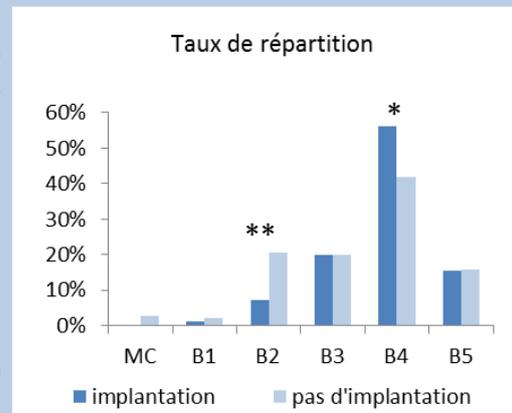
ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- AMP: assistance médicale à la procréation – BT: biopsie testiculaire – []: concentration – Nbe: nombre – PN: pronucleus – CP: culture prolongée.

Annexe 4. Analyse descriptive de la morphologie embryonnaire et de l'implantation

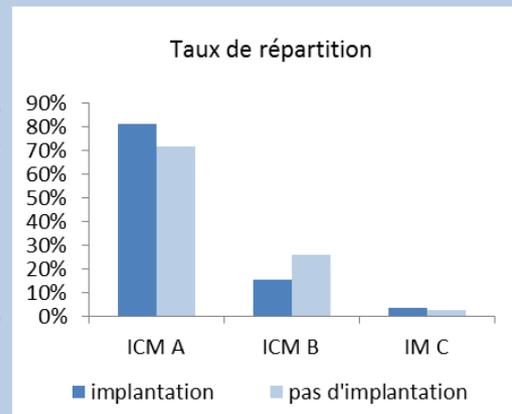
A. Comparaison de l'implantation en fonction de l'expansion des blastocystes

	Implantation	p-valeur	Pas d'implantation
Effectif	96 (38,9%)		151 (61,1%)
MC	0 (0,0%)	0,0082 **	4 (2,6%)
B1	1 (1,0%)		3 (2,0%)
B2	7 (7,3%)		31 (20,5%)
B3	19 (19,8%)		30 (19,9%)
B4	54 (56,3%)		63 (41,7%)
B5	15 (15,6%)		20 (13,2%)



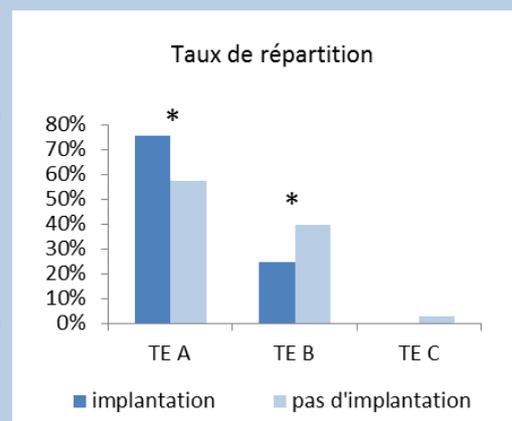
B. Comparaison de l'implantation en fonction du grade de l'ICM

	Implantation	p-valeur	Pas d'implantation
Effectif	86 (43,2%)		113 (56,8%)
ICM A	70 (81,4%)	0,1126	81 (71,7%)
ICM B	13 (15,1%)		29 (25,7%)
ICM C	3 (3,5%)		3 (2,7%)



C. Comparaison de l'implantation en fonction du grade du TE

	Implantation	p-valeur	Pas d'implantation
Effectif	86 (43,2%)		113 (56,8%)
TE A	65 (75,6%)	0,0080 **	65 (57,5%)
TE B	21 (24,4%)		45 (39,8%)
TE C	0 (0,0%)		3 (2,7%)



Notes:

- Les valeurs discrètes sont exprimées en valeur absolue (%).
- La significativité est exprimée de la façon suivante: de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».
- MC = morula, B = blastocyste, ICM = masse cellulaire interne, TE = trophoctoderme.

Annexe 5. Etude de la corrélation en fonction de l'issue clinique « naissances vivantes »

A. Analyse de régression logistique univariée pour les variables continues

	Statistiques descriptives	Régression logistique univariée			
	Moyenne ± ET	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité
AMH (ng/mL)	4,5 ± 3,6	1,759	[0,670 - 4,619]	0,252	ns
Âge paternel (ans)	34,4 ± 5,5	0,956	[0,908 - 1,101]	0,122	ns
Dose FSH initiale (UI/j)	225 ± 100,7	0,998	[0,995 - 1,001]	0,216	ns

B. Analyse de régression logistique univariée pour les variables discrètes

	Statistiques descriptives		Régression logistique univariée			
	Effectif	Taux de naissances vivantes	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité
IMC (kg/m²)						
≤19	22	31,8%	NA	NA	NA	NA
≤25	122	45,1%	1,759	[0,670 - 4,619]	0,252	ns
≤30	31	25,8%	0,745	[0,223 - 2,487]	0,633	ns
>30	26	26,9%	0,789	[0,227 - 2,748]	0,710	ns
Tabagisme						
Jamais	117	35,0%	NA	NA	NA	NA
Actif	41	36,6%	1,069	[0,510 - 2,242]	0,859	ns
Sevré	43	48,8%	1,769	[0,871 - 3,593]	0,114	ns
Origine spz						
BT	14	14,3%	NA	NA	NA	NA
Frais	176	39,8%	3,962	[0,860 - 18,245]	0,077	ns
Congelés	11	45,5%	5,000	[0,740 - 33,777]	0,099	ns

Notes:

- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- NA: non applicable, ET: écart-type, IMC: indice de masse corporelle, spz: spermatozoïdes, BT: biopsie testiculaire

Annexe 6. Etude de la corrélation en fonction de l'implantation

A. Analyse de régression logistique multivariée de la morphologie des embryons et du taux d'implantation

	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité
Expansion				
B3	NA	NA	NA	NA
B4	1,229	[0,593 - 2,548]	0,580	ns
B5	0,883	[0,338 - 2,304]	0,799	Ns
ICM				
A	NA	NA	NA	NA
B + C	0,860	[0,375 - 1,973]	0,722	ns
TE				
A	NA	NA	NA	NA
B + C	0,481	[0,226 - 1,020]	0,056	ns

B. Analyse de régression multivariée du taux d'implantation

	Odds ratio	95% IC	p-valeur	Significativité
Âge maternel	0,999	[0,924 - 1,080]	0,971	ns
Durée infertilité	0,890	[0,766 - 1,036]	0,133	ns
Type infertilité				
Primaire	NA	NA	NA	NA
Secondaire	2,002	[1,047 - 3,826]	0,036	*
Primo-secondaire	1,872	[0,503 - 6,960]	0,349	ns
N° stimulation				
1	NA	NA	NA	NA
2	0,780	[0,391 - 1,555]	0,480	ns
≥ 3	0,888	[0,414 - 1,908]	0,762	Ns
Dose FSH totale (UI)				
≤ 2000	NA	NA	NA	NA
≤ 2500	0,548	[0,239 - 1,259]	0,156	ns
≤ 3000	0,830	[0,333 - 2,070]	0,690	ns
> 3000	0,943	[0,417 - 2,131]	0,888	ns

Notes:

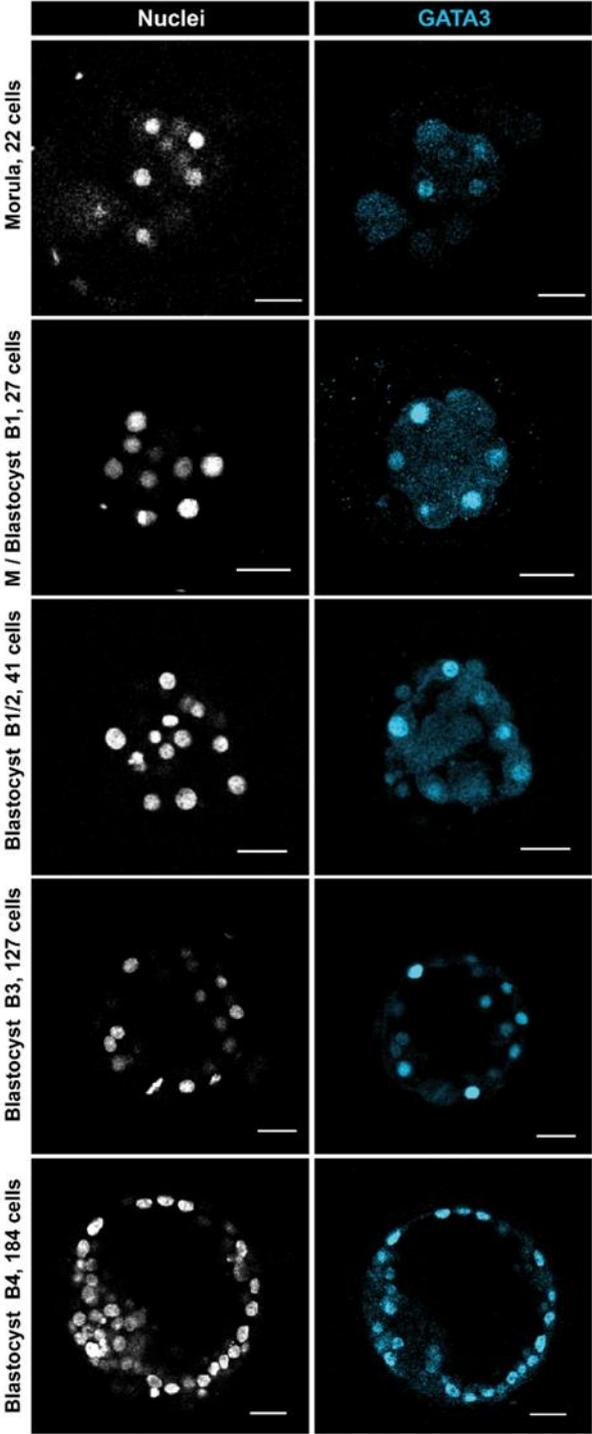
- La significativité est exprimée de la façon suivante:

ns: non significatif – de « * » à « *** »: de « peu significatif » à « très significatif ».

- NA: non applicable, B: blastocyste, ICM: masse cellulaire interne, TE: trophoctoderme, N°: numéro, FSH: hormone folliculo-stimulante, UI: unité internationale.

Annexe 7. Immunofluorescence GATA3

Immunofluorescence GATA3 (cyan) avec un contre-marquage nucléaire (blanc) à différents stades de développement de l'embryon humain pré-implantatoire. Notes: Blastocyst: blastocyste, cells: cellules; nuclei: noyaux.



Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

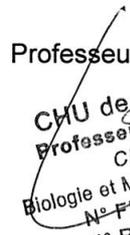
Professeur BARRIERE



CHU DE NANTES - HME
Biologie de la Reproduction
33 Boulevard Jean Monnet

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Professeur Thomas FREOUR



CHU de NANTES - FEA
Professeur Thomas FREOUR
Chef de Service
Biologie et Médecine de la reproduction
N° FINESS : 440000271
N° RPPS : 10004374657

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascale JOLLIET

NOM : FIRMIN

PRENOM : Julie

Titre de Thèse :

**CARACTERISATION DU TROPHECTODERME HUMAIN PRE-IMPLANTATOIRE
VERS L'IDENTIFICATION DE MARQUEURS SPECIFIQUES DE LA QUALITE
EMBRYONNAIRE EN FECONDATION *IN VITRO*.**

RESUME

En fécondation *in vitro* (FIV), la sélection de l'embryon à transférer repose sur son évaluation morphologique. Cette étude montre qu'au stade blastocyste, les taux de naissances vivantes sont plus corrélés au grade du trophectoderme (TE) qu'aux autres paramètres évalués ($p < 0.05$). Cependant, cette évaluation morphologique est peu prédictive des issues cliniques. C'est pourquoi, il est nécessaire de mieux comprendre le développement de l'embryon humain pré-implantatoire afin de définir de nouveaux marqueurs spécifiques de la qualité des embryons en FIV. Dans cette optique, le facteur de transcription NR2F2, avec une expression restreinte au TE polaire, pourrait être un acteur central de la différenciation du TE et de l'acquisition d'une compétence fonctionnelle du TE pour l'implantation de l'embryon humain.

MOTS-CLES

Fécondation *in vitro* – Blastocyste – Trophectoderme – Taux de naissances vivantes
– Facteur de transcription